

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOCHIMIE DU SOUFRE CHEZ E. COLI SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE

THESE PRESENTEE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE NANCY POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY, MENTION « PHAR-
MACIE », PAR **Jean CHASTE**, PHARMACIEN, CHEF
DE TRAVAUX PRATIQUES (DELEGUE), EX-INTERNE
DES HOPITAUX DE NANCY, LAUREAT DE LA FA-
CULTÉ ET DES HOPITAUX, DIPLOMÉ D'ETUDES
SUPERIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE, DIPLOMÉ
D'ETUDES SUPERIEURES DE MICROBIOLOGIE, DI-
PLOMÉ D'ETUDES SPECIALES DE SEROLOGIE, NÉ
A NEUFCHATEAU, LE 7 NOVEMBRE 1936.

SOUTENUE LE 23 NOVEMBRE 1963 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

PRÉSIDENT : M. Le Doyen KAYSER

JUGES : M^{lle} BESSON, Professeur

M. PIERFITTE, Maître de Conférences

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA BIOCHIMIE DU SOUTRE
CHEZ LE COIT SENSIBLE ET
RESISTANT A LA MALARIA

ODART - CLEMENT
& C^{IE}

RELIEURS

11, RUE SAINTE-ANNE, 11
TÉLÉPH. 52.80.09 - NANCY

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOCHIMIE DU SOUFRE CHEZ E. COLI SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE

THESE PRESENTEE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE NANCY POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY, MENTION « PHAR-
MACIE », PAR **Jean CHASTE**, PHARMACIEN, CHEF
DE TRAVAUX PRATIQUES (DELEGUE), EX-INTERNE
DES HOPITAUX DE NANCY, LAUREAT DE LA FA-
CULTÉ ET DES HOPITAUX, DIPLOMÉ D'ETUDES
SUPERIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE, DIPLOMÉ
D'ETUDES SUPERIEURES DE MICROBIOLOGIE, DI-
PLOMÉ D'ETUDES SPECIALES DE SEROLOGIE, NÉ
A NEUFCHATEAU, LE 7 NOVEMBRE 1936.

SOUTENUE LE 23 NOVEMBRE 1963 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

PRÉSIDENT : M. Le Doyen KAYSER

JUGES : M^{lle} BESSON, Professeur

M. PIERFITTE, Maître de Conférences

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA BIOCHIMIE DU SOUTÈRE CHEZ E. COLI SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE



THÈSE PRÉSENTÉE A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE NANCY POUR OBTENIR LE TITRE DE DOCTEUR
DE PHARMACIE DE NANCY, MENTION « PHARMACIE »
PAR JEAN CHASTÉ, PHARMACIEN, CHIR.
DE TRAVAUX PRATIQUES (DECHU), EX-INTERNE
DES HÔPITAUX DE NANCY, LAUREAT DE LA 1-2-3
CLASSE ET DES HÔPITAUX, DIPLOME D'ÉTUDES
SUPÉRIEURES DE CHIMIE BIOLOGIQUE, DIPLOME
D'ÉTUDES SUPÉRIEURES DE MICROBIOLOGIE, DI-
PLOME D'ÉTUDES SPÉCIALES DE SÉROLOGIE, INE
A NEUCHÂTEL, LE 7 NOVEMBRE 1967.

SOUTENUE LE 23 NOVEMBRE 1967 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

PRÉSIDENT : M. le Docteur KAYSER

JUGE : M. le Docteur BISSON, Pharmacien

M. PIERRE, Maître de Conférences

FACULTE DE PHARMACIE
UNIVERSITE DE NANCY

ADMINISTRATION

DOYEN

Professeur : A. BERNANOSE

ASSESSEUR

Professeur : A. MEUNIER

SECRETAIRE PRINCIPAL

B. SEUROT

Personnel enseignant

Professeurs

M. MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle FRANCOIS M. Th	Matière médicale
MM. KAYSER	Chimie
FRANQUET R.	Botanique
MARCHAL J.G.	Microbiologie
STEIMETZ E.	Sciences Naturelles
BLOCH J.M.	Toxicologie
SOLEIL J.	Pharmacie chimique
BERNANOSE A.	Physique
Mlle BESSON S.	Pharmacodynamie

Professeur sans chaire

M. BENE R.	C.E.S. Microbiologie
------------	----------------------

Maîtres de Conférences agrégés

MM. MIRJOLET M.	Sciences physicochimiques
PELT J.M.	Matière médicale
PIERFITTE M.	Chimie biologique

Chargés de cours complémentaires

MM. MEUNIER A.	Hydrologie
Mlle FRANCOIS M. Th	Hygiène
MM. KAYSER F.	Biochimie technique
FRANQUET R.	Cryptogamie
MARCHAL J.G.	Parasitologie
STEIMETZ J.G.	Mycologie-Minéralogie
BLOCH J.M.	Chimie minérale
SOLEIL J.	Chimie organique
BERNANOSE A.	Chimie organique
	- Optique et Acoustique
	- Mathématiques préparatoires

Mlle BESSON S.

MM. LAGARDE (Maître de conf. à
la Faculté de Droit)

BENE R.

PIERFITTE M.

ANZIANI P.

Mme LASSEUR A.

Mlle GIRARD Th.

Mme BALDO S.

Application thérapeutique de
la pharmacodynamie
Déontologie

Bactériologie

C.E.S. Chimie Biologique

Caractères analytiques des sels

Techniques spéciales d'analyse

Techniques du diagnostic bactériolo-
gique au laboratoire

Techniques des examens parasi-
tologiques et de l'analyse coprologique

Chefs de Travaux

M. ANZIANI P.

Mme LASSEUR A.

Mlle GIRARD Th. (délégué)

MM. HAYON J. Cl.

AIMOND P.

CHASTE J.

BONALY R.

RENSON F.

Chimie

Microbiologie-Parasitologie

Microbiologie C.E.S.

Micrographie

Chimie

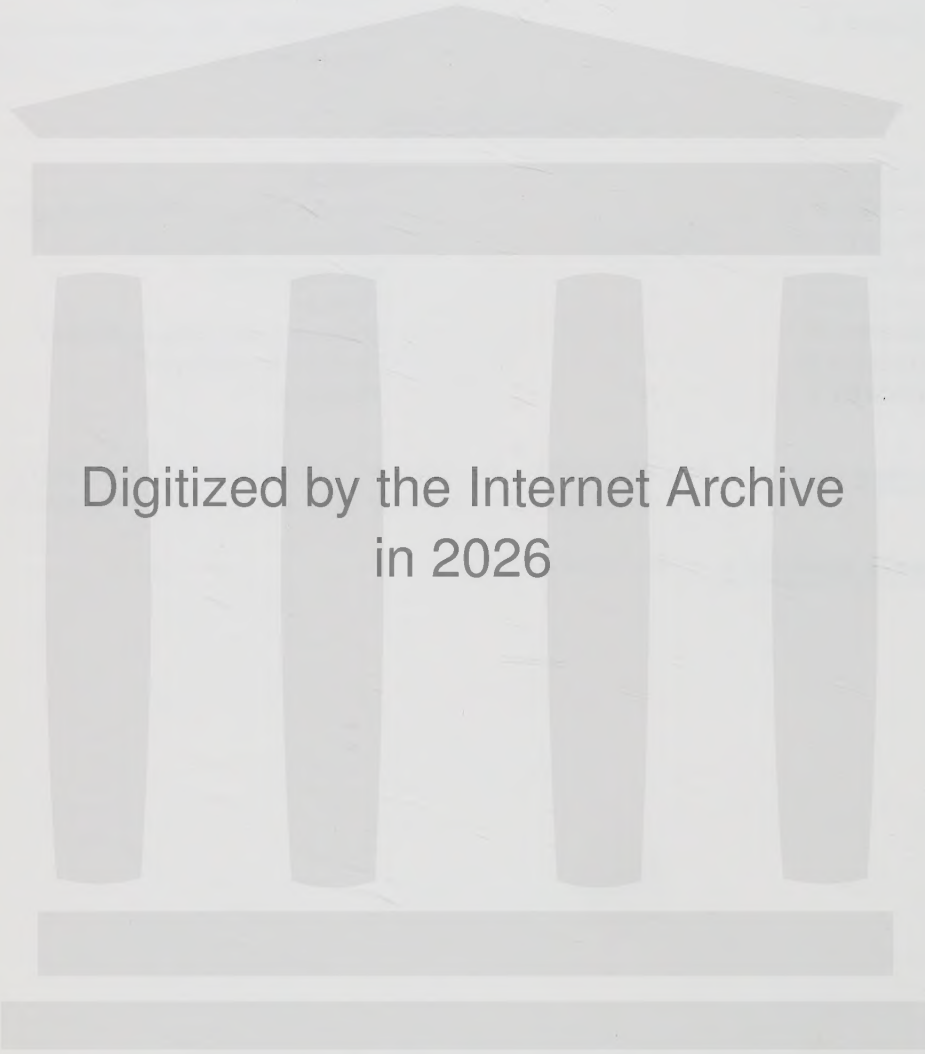
Sciences pharmaceutiques

Chimie biologique

Physique

Doyens honoraires : M. RICHARD, Recteur de l'Académie de Montpellier
M. KAYSER, Professeur à la Faculté de Pharmacie

Professeur honoraire : M. CORDEBARD



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555808_0042

A MES PARENTS

à qui je dois tout ce que je suis

A MES FRERES ET SOEURS

A TOUS LES MIENS ET A TOUS MES AMIS

en témoignage de ma profonde affection

A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Doyen KAYSER
Professeur de Chimie

A MES JUGES

Mademoiselle BESSON
Professeur de Pharmacodynamie

Monsieur PIERFITTE
Maître de Conférences Agrégé de Chimie biologique

A TOUS MES MAITRES

de la Faculté de Pharmacie de Nancy
et dans les Hôpitaux

HOMMAGE RESPECTUEUX ET RECONNAISSANT

AVANT - PROPOS

Avant de commencer l'exposé de nos recherches, il nous est particulièrement agréable de remercier ici tous ceux qui en ont permis la réalisation :

Monsieur le Doyen KAYSER, Professeur de Chimie Biologique, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire alors que nous venions d'obtenir notre diplôme de Pharmacien et dont les conseils avisés nous furent d'un grand secours lors de la rédaction de cette thèse .

Mademoiselle BESSON, Professeur de Pharmacodynamie, qui nous a fait beaucoup d'honneur en acceptant de juger ce travail et dont nous avons pu apprécier le dévouement tant au cours de notre scolarité que durant notre internat .

Monsieur PIERFITTE, Maître de Conférences Agrégé de Chimie Biologique, dont l'aide constante lors de notre expérimentation et lors de la rédaction de ce travail fut pour nous essentielle . Que Monsieur PIERFITTE veuille bien trouver ici l'expression de notre immense gratitude .

Je ne saurais oublier tous mes camarades du Laboratoire de Chimie dont l'amitié et l'aide ont contribué à me faire conserver un souvenir impérissable des années passées à la réalisation de ce travail .

ABREVIATIONS UTILISEES

SA = sulfanilamide .

E. coli N = souche sensible à la sulfanilamide .

E. coli SA 5 et E. coli SA 10 = souches résistantes à 5 g/l de SA pour la première et 10 g/l de SA pour la seconde .

Milieu N = milieu synthétique glucose-sels .

Milieus SA 5 et SA 10 = le même additionné de 5 g/l de SA pour le premier et 10 g/l de SA pour le second .

Milieu S^{*} = milieu synthétique glucose-sels additionné de traceur radioactif $^{35}\text{SO}_4^{--}$

Milieu S^{*} + M = le même contenant en plus de la méthionine non marquée .

Milieu S + M^{*} = milieu synthétique glucose-sels additionné de méthionine marquée au ^{35}S .

Milieu NS 0,5 M = milieu N saccharosé 0,5 M .

D.O. = densité optique mesurée en tube de 18 mm de diamètre à $\lambda = 610 \text{ m}\mu$, exprimée en centième de D.O. après déduction de la valeur initiale .

RA = radioactivité, exprimée en coups par minute .

RAT = radioactivité des bactéries totales en coups par minute .

RAP = radioactivité des protéines bactériennes en coups par minute .

c/min = coups par minute .

TCA = acide trichloracétique .

PAB = acide paraaminobenzoïque .

G = glutathion .

C = cystéine .

M = méthionine .

INTRODUCTION

Peu de temps après la découverte par WOODS et FILDES (69) des propriétés antisulfamides de l'acide paraaminobenzoïque (PAB) dues à une compétition entre sulfamide et PAB pour la synthèse de l'acide folique, HARRIS et KOHN (17) montrèrent que la méthionine était, elle aussi, douée d'un certain pouvoir inhibiteur vis-à-vis des sulfamides, expliqué depuis par le rôle que joue l'acide folique dans la synthèse de cet acide aminé. Mais si l'on sait bien à quel phénomène attribuer les propriétés inhibitrices des sulfamides, on ne sait pas encore exactement à quoi est dû le développement de la résistance à ces drogues chez les microorganismes.

L'objet de ce travail a été de déterminer si des colibacilles rendus résistants à la sulfanilamide synthétisaient une quantité de méthionine supérieure à celle qui est normalement élaborée par des colibacilles sensibles à cette drogue, phénomène qui pourrait rendre compte de la résistance acquise par les germes sulfamido-résistants.

Avant d'entreprendre l'exposé de nos travaux, il nous paraît nécessaire de faire brièvement le point de nos connaissances actuelles sur le métabolisme du soufre et de la méthionine chez les microorganismes puis d'envisager comment les sulfamides interviennent dans la biosynthèse de l'acide folique, afin d'étudier les différentes hypothèses que l'on peut actuellement proposer pour expliquer par quel mécanisme la résistance bactérienne aux sulfamides s'acquiert et se maintient.

I . METABOLISME DU SOUFRE

A . DIVERSES FORMES DU SOUFRE CHEZ LES ETRES VIVANTS

Chez les végétaux comme chez les animaux, le soufre existe sous les formes organiques les plus diverses, nous citerons :

1 . Les acides aminés soufrés parmi lesquels cystéine, cystine, homocystéine, et méthionine se rencontrent le plus fréquemment .

2 . Les thiols dont fait partie le coenzyme A où le groupement SH est l'élément réactionnel .

3 . Les nombreux et importants cofacteurs renfermant du soufre tels que thiamine, biotine, acide lipoïque .

4 . Les esters sulfuriques de nature glucidique dont certains peuvent être très actifs tels que l'héparine ; ou de nature lipidique, ce sont les sulfatides dans lesquels l'acide sulfurique pourrait jouer le rôle de l'acide phosphorique dans les phospholipides .

5 . Les sulfoconjugués d'élimination qui participent à la détoxication des organismes ou à la transformation de diverses molécules .

Chez les microorganismes, on peut rencontrer en plus des composés déjà cités du soufre à l'état libre (Thiobactériales ou Sulfuraires) .

En ce qui concerne *E. coli*, le soufre représente environ 1 % du poids sec des bactéries et se retrouve pour 75 % dans les protéines sous forme de cystéine et méthionine . Le reste se trouve sous forme de composés acidosolubles, principalement le glutathion et de quantités très faibles de cofacteurs (Coenzyme A, thiamine, acide lipoïque et biotine) (27) .

L'importance de la carence en soufre chez *E. coli* a été étudiée par ROBERTS et coll. (46) . La croissance observée dans un milieu où aucune source de soufre n'a été ajoutée est très faible et correspond à l'utilisation par les bactéries de réserves internes de soufre (glutathion et protéines alcool-solubles) . Il y a donc impossibilité pour *E. coli* de croître en l'absence de source de soufre .

Ces auteurs (46) ont étudié la répartition du soufre entre les divers constituants de *E. coli* :

95 % du soufre se trouvent dans les aminoacides cystéine et méthionine et se répartissent ainsi entre les diverses fractions bacillaires :

25 % dans la fraction acidosoluble dans TCA à froid
12,5 % dans la fraction alcoolosoluble
et 62,5 % dans les protéines résiduelles .

HUANG (20) a décelé la présence d'un autre acide aminé soufré, la L-homolanthionine qui s'accumule chez un mutant *E. coli* méthionine (-), et dont c'est la première fois qu'on le met en évidence dans un système vivant .

B . SOURCES DE SOUFRE CHEZ LES MICROORGANISMES

Le soufre nécessaire aux microorganismes peut leur être fourni sous différentes formes . Ainsi les différentes sources de soufre qui permettent la croissance normale de *E. coli* ont été étudiées par ROBERTS et coll. (46), ce sont le thiosulfate, le sulfite, le sulfate, la cystine, la lanthionine et la S-méthyl-cystéine . Ces différents corps peuvent servir comme seule source de soufre .

La source de soufre la plus couramment rencontrée par les microorganismes dans leur milieu naturel est vraisemblablement le sulfate . Mais, certains autres composés soufrés peuvent être aussi utilisés . Ainsi, MAW (33) (34) a essayé 41 composés susceptibles de remplacer le sulfate pour la levure de bière . Seul, un petit nombre d'entre eux permet la croissance . Les plus efficaces sont sulfite, thiosulfate glutathion, L-méthionine et certains de ses dérivés . La L-cystéine est moins bien utilisée que la L-méthionine et les sulfures ne sont pas utilisés .

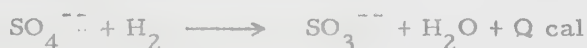
Les Mycobactéries utilisent également le sulfate pour la synthèse protéique . Le soufre incorporé est retrouvé dans cystine et méthionine (63) . STERNBERG (58) a mis en évidence chez le BCG l'incorporation du soufre dans les lipides soufrés à partir du sulfate . *Euglena gracilis* utilise aussi le sulfate pour synthétiser des sulfolipides (1) . PRESCOTT (43) étudiant différentes sources de soufre pour *Streptococcus brevis*, a montré que l'état d'oxydation de la source de S était un facteur important pour l'utilisation du soufre : sulfate et sulfite ne sont pas utilisés, thiosulfate et sulfures sont utilisés de même que cystéine et cystine .

Enfin, chez *E. coli*, COWIE (9) a montré que les échanges du soufre fixé par les bactéries à partir du sulfate, avec le milieu extérieur, sont très faibles . La majeure partie du soufre fixé reste donc dans les bactéries où il fait alors partie intégrante de la matière vivante .

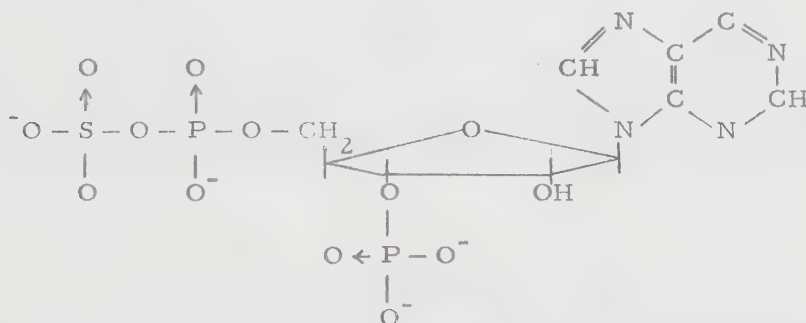
Quels sont donc les processus de l'utilisation du sulfate par les microorganismes ?

C . PROCESSUS DE L'UTILISATION DU SULFATE PAR LES MICROORGANISMES

Il semble qu'avant d'être incorporé dans une molécule organique, le sulfate doit être réduit en sulfite puis en sulfure . Ainsi, ROBERTS (46) a montré que le sulfite était préféré au sulfate comme source de soufre pour *E. coli* . WILSON (68) a mis en évidence la réduction du sulfate en sulfite par un système enzymatique isolé de la levure . Mais la réduction du sulfate en sulfite est une réaction très défavorable au point de vue thermodynamique



Aussi cette réduction nécessite une activation préalable du sulfate . ROBBINS et LIPPMANN ont en effet isolé une forme active du sulfate, le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate ou PAPS dont la formule est la suivante (15) :



- a) $\text{ATP} + \text{SO}_4^{--} \rightleftharpoons \text{adénosine 5'-phosphosulfate (APS)} + \text{pyrophosphate (PP)}$
 réaction catalysée par l'adénosine-triphosphate-sulfate-adényl-transférase .
- b) L'adénosine-5'-phosphosulfate formé réagit avec une nouvelle molécule d'ATP pour donner PAPS
 $\text{APS} + \text{ATP} \longrightarrow \text{PAPS} + \text{ADP}$
 réaction catalysée par l'adénosine-triphosphate-adényl-sulfate-3'-phosphotransférase .

Ces enzymes sont présents chez *E. coli* et *B. subtilis* (37) . Quand *E. coli* est cultivé en présence de cystine au lieu de sulfate, la formation de PAPS est inhibée (37), ce qui explique que l'incorporation du sulfate dans les protéines de *E. coli* soit abolie en présence de cet acide aminé, comme l'a montré ROBERTS (46) .

PAPS servirait de substrat à la sulfate-réductase PECK (38) pense que le sulfite formé par cet enzyme serait à son tour réduit en sulfure par une sulfite-réductase. La sulfite-réductase est inhibée spécifiquement par la présence de cystéine ou de méthionine dans le milieu de culture. Cette inhibition reflète une "feed back" repression de la sulfite-réductase. Le sulfure serait probablement la forme inorganique du soufre qui est, en définitive, incorporée dans le matériel cellulaire organique. Cette dernière forme de soufre permettrait donc le passage à la cystéine puis au glutathion ou à la méthionine.

a) Biosynthèse de la cystéine

Par réaction avec la sérine, le sulfure formé par réduction du sulfate formé par réduction du sulfate fournit la cystéine. L'enzyme impliqué dans cette réaction, la sérine sulphydrase, a pour coenzyme le phosphate de pyridoxal (64).



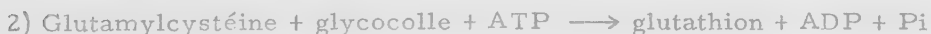
Etudiant la synthèse de la cystéine chez *Aspergillus nidulans* à l'aide d'un mutant cystéine (-), NAKAMURA (36) a mis en évidence une accumulation de S-sulfocystéine chez ce microorganisme où la S-sulfocystéine serait le précurseur de la cystéine.

b) Biosynthèse du glutathion

Une partie de la cystéine synthétisée par les bactéries se retrouve dans le tripeptide glutathion. Sa synthèse s'effectue en 2 étapes (60).

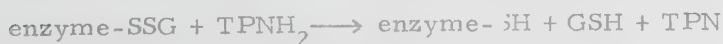


Cette réaction est catalysée par la γ glutamylsynthétase. Puis sous l'action de la glutathion synthétase :



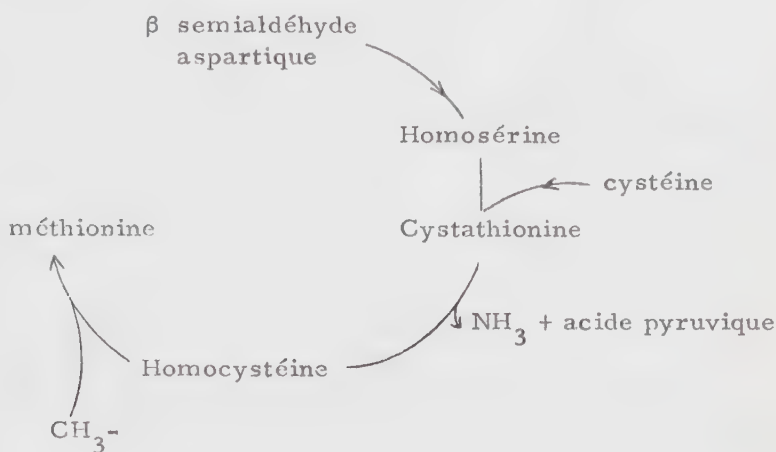
La cystéine est la fraction qui confère au glutathion (GSH) des propriétés caractéristiques, elle s'oxyde réversiblement en cystine en donnant le glutathion oxydé (G-S-S-G).

Chez *E. coli* existe une glutathion-réductase (2). Cet enzyme est porteur d'un groupement -SH; il permet le passage du glutathion oxydé au glutathion réduit suivant les réactions :



c) Biosynthèse de la méthionine

Celle-ci est bien connue dans ses grandes lignes . UMBARGER et DAVIS (64) donnent le schéma suivant de cette synthèse chez les microorganismes .



Un même processus de synthèse de la méthionine a été confirmé par PIGG et coll. chez la levure (41) .

Le détail de la dernière réaction consistant en la fixation d'un groupement méthyle sur l'homocystéine et les problèmes concernant l'origine de ce groupement n'ont été élucidés que récemment .

Dès 1954, WOODS (70) avait acquis la certitude que l'acide paraaminobenzoïque (PAB) et l'acide folique intervenaient dans la biosynthèse d'un certain nombre d'acides aminés dont la méthionine . Plus tard, SZULMAJSTER et WOODS (61) montrèrent que la sérine était la source du fragment à un atome de carbone intervenant dans la méthylation de l'homocystéine .

Dernièrement, LARRABEE (25) et CATHOU (6) ont montré que chez *E. coli* la synthèse de la méthionine se faisait par une réaction de transméthylation entre l'acide 5-méthyltétrahydrofolique et l'homocystéine .

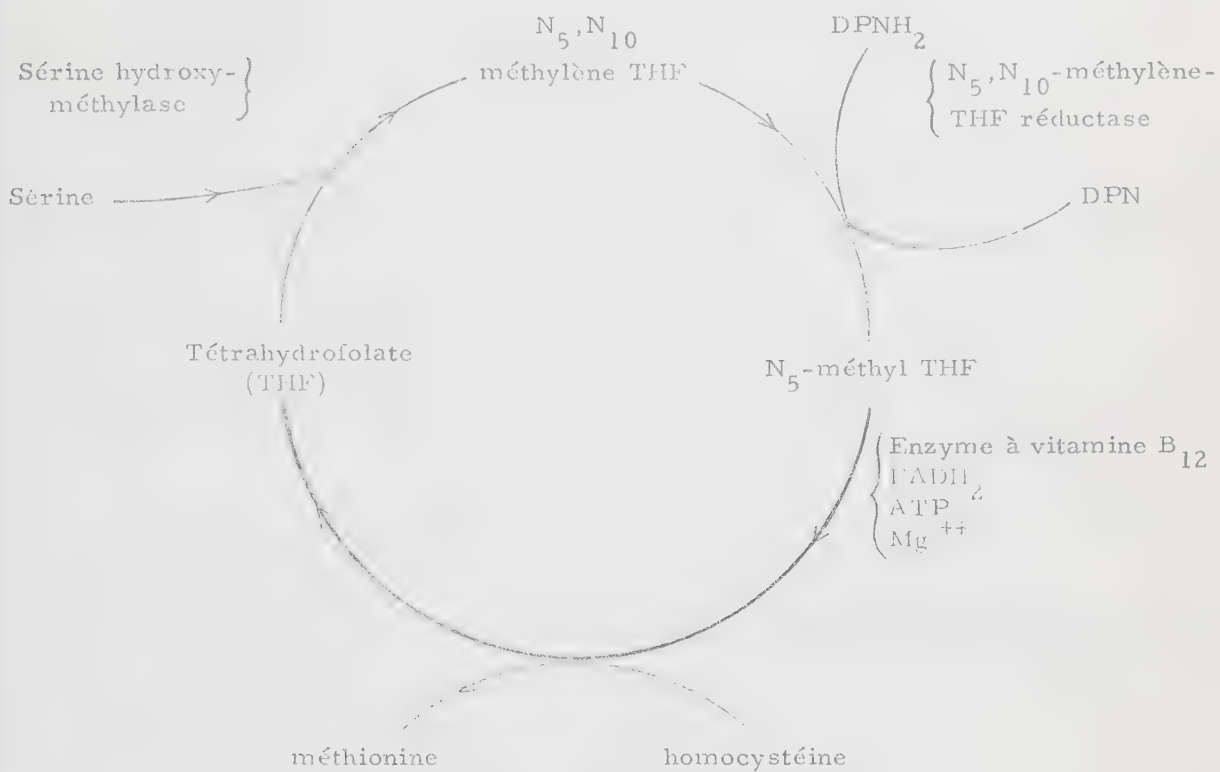
Les travaux de BUCHANAN, cité par STOKSTAD (59), ont révélé que trois systèmes enzymatiques sont impliqués dans le passage de l'atome de carbone β de la sérine sur l'homocystéine, fournissant ainsi la méthionine . Ces enzymes sont :

- La sérine hydroxyméthylase qui transfère le radical à un carbone sur le tétrahydrofolate (THF) pour donner le N5, N10-méthylène THFA .

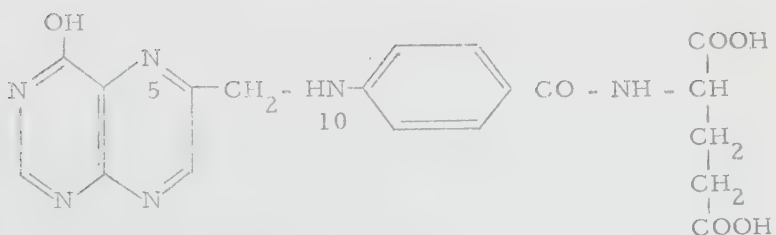
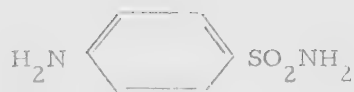
- L'enzyme " 205-2 " qui réduit le N5, N10-méthylène THFA en N5-méthyl THF .

- Un enzyme qui renferme la vitamine B12 et qui transfère le radical méthyle du dérivé tétrahydrofolique à la méthionine .

LARRABEE (25) donne le schéma suivant de cette synthèse :



sulfanilamide



Acide folique

Figure n° 1

GUERT et WOODS (59) ont proposé deux voies pour la synthèse de la méthionine, l'une impliquant un coenzyme folique, l'autre impliquant THF et la cobalamine. La première voie est indépendante de la cobalamine et présente un besoin strict d'un coenzyme folique polyglutamique. La seconde voie est dépendante de la cobalamine et fonctionne avec le monoglutamate.

Deux processus tout différents de synthèse de la méthionine ont été découverts par SHAPIRO et coll. (55) (39). Ces auteurs ont montré que la méthionine pouvait être produite par transadénosylation à partir de la S-adénosyl méthionine.



ou par une réaction de transméthylation à partir de la S-méthylméthionine :



Cependant, le détail de ces réactions n'est pas encore bien connu.

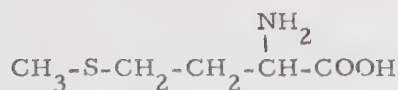
d) Contrôle de la synthèse de la méthionine chez les microorganismes

COWIE (10) (11) a montré que *E. coli* cultivé dans des milieux contenant de la méthionine incorporait cet acide aminé.

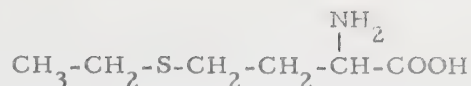
MANDEL (32) inhibe la fixation de méthionine exogène par *Bacillus cereus* au moyen de la 8-azaguanine qui est un antagoniste des bases puriques. Suivant la concentration d'azaguanine dans le milieu, celle-ci s'incorpore de plus en plus dans les acides nucléiques en même temps que diminue le pourcentage d'incorporation de la méthionine. L'azaguanine n'empêche pas la fixation de la cystine et son utilisation pour synthétiser du glutathion mais bloque le passage à la méthionine.

WIJESUNDERA et WOODS (67) pensent que lorsque *E. coli* est cultivé en présence de méthionine, il perd la capacité de synthétiser les enzymes impliqués dans la méthylation de l'homocystéine. Cette répression enzymatique est levée par simple subculture dans un milieu sans méthionine (47). La cystathionase serait également inhibée par la présence de méthionine (48).

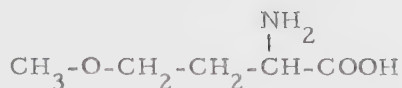
Un certain nombre d'analogues d'acides aminés soufrés sont des antagonistes de la méthionine (57) chez *E. coli*. L'éthionine, la méthoxinine, la norleucine, la cis-crotonylglycine sont des inhibiteurs de la synthèse de la méthionine et leurs effets sont levés par la présence de méthionine.



méthionine



éthionine



méthoxinine

Chez différentes souches de levures de bière étudiées par MAW (35), l'effet inhibiteur de l'éthionine a pu être levé par la L-méthionine, la S-méthylcystéine, la méthionine-sulfoxyde et l'acide DL α aminobutyrique. La S-éthyl-L-cystéine ne lève pas l'inhibition. Enfin, la sélénométhionine dans laquelle l'atome de S a été remplacé par un atome de Se peut entrer en compétition avec la méthionine et permettre la croissance d'un mutant de *E. coli*. La croissance de *E. coli* et *S. cerevisiae* dans un milieu contenant du sélénite et une source de soufre conduit à la formation de protéines contenant de la sélénométhionine et peut-être de la sélénocystine (57). Cependant le sélénium ne peut remplacer entièrement le soufre pour les besoins de *E. coli* (3).

II . MODE D'ACTION DES SULFAMIDES

La synthèse des coenzymes de l'acide folique par les organismes auxotrophes nécessite une première étape dans laquelle l'acide paraaminobenzoïque (PAB) se combine avec le noyau ptéridine. C'est ici que se trouve le point d'action des sulfamides qui sont des antagonistes du PAB. Ainsi, le sulfathiazole inhibe la synthèse de la méthionine depuis l'homocystéine et celle de l'acide folique depuis PAB. Ceci implique que PAB doit être converti en acide folique avant d'exercer son action (23).

Les relations entre les sulfamides et l'acide folique apparaissent en comparant la formule du PAB et celle de la sulfanilamide (voir figure n° 1). Dans l'acide folique PAB apparaît sous forme d'une paraaminobenzamide substituée et la sulfanilamide n'en diffère que parce qu'elle est une amide de l'acide p. aminobenzènesulfonique. Ainsi peut s'expliquer le pouvoir antisulfamide de PAB découvert par WOODS et FILDES en 1940 (69); les sulfamides entrent en compétition avec PAB dans la synthèse de l'acide folique et perturbent cette synthèse.

BROWN (5) a montré que la synthèse folique est bien inhibée au niveau de la combinaison du PAB et de la 2-amino-4-hydroxy-6-hydroxyméthyldihydroptéridine qui conduit normalement au dihydroptéroate .

SHIVE et ROBERTS (56) ont montré que cet antagonisme compétitif s'établit à un taux de 1 molécule de PAB pour 3 000 molécules de sulfanilamide quelle que soit la concentration de la sulfanilamide dans le milieu extérieur . Ici déjà, se trouve donc un phénomène difficilement explicable : pourquoi faut-il 3 000 molécules de sulfanilamide pour inactiver 1 molécule de PAB ?

D'autre part, on peut se demander avec WOODS (70) si l'acide folique est la seule forme d'utilisation du PAB . En effet, si c'était le cas, cela devrait entraîner deux conséquences :

1) L'acide folique doit pouvoir remplacer le PAB chez les microorganismes PAB (-) .

2) L'acide folique doit avoir un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des sulfamides et cette neutralisation doit pouvoir s'effectuer avec une concentration en acide folique indépendante de la concentration en sulfanilamide, et cela est loin d'être toujours le cas, notamment avec *E. coli* .

D'autres substances que PAB sont douées d'une activité antisulfamide, la méthionine en particulier peut atténuer l'action des sulfamides mais ne rend pas *E. coli* insensible (18) ; le glycocolle, la sérine, la guanine, la xanthine renforcent son action (18) (56) . Cette action antisulfamide de la méthionine se trouve expliquée par le rôle que joue l'acide folique dans sa synthèse et suggère une possibilité de perturbation dans le métabolisme de ce facteur par les sulfamides .

D'autres phénomènes demeurent inexpliqués . On pouvait penser que les dérivés sulfamidés de l'acide folique dans lesquels une molécule de PAB aurait été remplacée par une molécule de sulfamide seraient des antagonistes de l'acide folique . De tels composés synthétisés par FORREST et WALKER (14) se sont montrés dénués d'activité pharmacologique appréciable .

Enfin, HOSSACK (19) a montré que la fixation du noyau pyrimidinique sur le PAB (p-aminobenzamidopyrimidine) diminue son activité alors que ce même noyau fixé sur la sulfanilamide (sulfadiazine) renforce l'activité .

La connaissance du mécanisme exact de l'intervention des sulfamides dans le métabolisme bactérien est donc assez bien élucidée, mais un autre problème, celui de la résistance des bactéries aux sulfamides, reste inexpliqué. Nous allons donc maintenant envisager les différentes hypothèses qui sont susceptibles d'expliquer la sulfamidorésistance.

III. PROBLEMES GENERAUX CONCERNANT LA RESISTANCE BACTERIELLE AUX SULFAMIDES

A la lumière des phénomènes que nous avons passés en revue, nous pouvons avancer que les sulfamides perturbent la synthèse de l'acide folique, par effet compétitif avec PAB.

La résistance des microorganismes à l'action d'une drogue douée d'une activité antimétabolique peut être le résultat de diverses réactions d'adaptation :

1) Les cellules peuvent synthétiser un enzyme qui détruit l'inhibiteur. Il n'a pas été trouvé de tel enzyme dans le cas des sulfamides.

2) Les cellules peuvent produire l'enzyme qui est bloqué en quantité supérieure à la normale de façon à ce qu'il reste un excès d'enzyme capable d'agir dans le métabolisme normal.

3) Les cellules peuvent produire une quantité accrue d'une substance déplaçant l'antagoniste de l'enzyme. Ainsi, il a été montré que certains germes sulfamidorésistants produisent plus de PAB que les souches normales (24).

4) La structure fine de l'enzyme peut être génétiquement modifiée chez les cellules résistantes, diminuant ainsi sa capacité de combinaison avec l'antagoniste.

5) Les cellules peuvent devenir moins perméables à l'antagoniste.

6) Les cellules peuvent élaborer une voie métabolique qui "évite" la réaction enzymatique bloquée par l'antagoniste.

Il n'est pas impossible même de voir associés chez un même organisme plusieurs de ces processus de résistance. Ainsi SEVAG et ISHII (53) étudiant la synthèse de l'acide folique par *E. coli* cultivé en présence de sulfathiazol ont montré que les cellules résistantes synthétisaient plus d'acide folique que les cellules sensibles.

Ces cellules acquièrent la possibilité de synthétiser l'acide folique depuis PAB et un dérivé synthétique de la ptéridine : la 2-amino-4-hydroxy-6-carboxyptéridine .

Pour expliquer ce phénomène, SEVAG et YOKOTA (54) émettent l'hypothèse que le sulfathiazol, réagissant avec certaines cellules normales, induit des changements évolutifs grâce auxquels les cellules qui ne peuvent être dirigées vers cette phase d'évolution sont éliminées . La drogue jouerait d'abord un rôle de catalyseur négatif, puis de catalyseur positif . Ainsi le sulfathazol inhibe les enzymes qui synthétisent l'acide folique, ce qui entraîne l'accumulation d'une grande quantité de PAB et augmente simultanément l'accumulation de ptéridine . La présence de ces deux composés en large excès augmenterait alors la capacité de synthèse enzymatique pour l'acide folique d'où l'apparition des caractères de résistance des organismes .

HOTCHKISS et EVANS ont conféré le caractère de résistance à la sulfamide à plusieurs souches de pneumocoques sensibles par l'intermédiaires acide desoxyribonucléique extrait d'une souche résistante (21) . Il est apparu que le matériel génétique contenait trois gènes différents capables de conférer le caractère de résistance . Leur combinaison pouvant former huit souches différentes plus ou moins sulfamidorésistantes . L'effet des trois gènes est additif et la souche possédant les trois gènes est la plus sulfamidorésistante . Les souches ne produisent pas plus de PAB l'une que l'autre . Par conséquent les différences de sulfamidorésistance observées entre les trois souches sont dues à une différence d'affinité pour la sulfamide des enzymes conduisant à la synthèse de l'acide folique dans chacune des souches .

Les mécanismes de résistance aux sulfamides semblent donc très divers . Les problèmes posés par cette diversité ne sont pas encore résolus et nécessitent une vaste expérimentation .

Nous venons de voir le rôle des coenzymes foliques dans la synthèse de la méthionine et nous avons indiqué quel était le mode d'action des sulfamides .

Certains auteurs ayant montré l'action antisulfamide de la méthionine, nous nous sommes proposé de déterminer si des souches résistantes de *E. coli* synthétisent des quantités accrues de méthionine, ce qui pourrait rendre compte de leur résistance . Nous allons donc exposer les techniques que nous avons utilisées pour comparer le métabolisme de la méthionine chez une souche sensible à la sulfamilamide et chez des souches rendues résistantes à cette drogue .

CHAPITRE I

TECHNIQUES GENERALES UTILISEES

Avant d'entreprendre l'étude détaillée de l'incorporation du soufre chez *E. coli*, nous décrirons dans ce chapitre les techniques de base qui nous ont permis d'aborder cette étude. Nous envisagerons successivement :

- a) La souche utilisée, le milieu sur lequel nous l'avons cultivée et la mesure de la croissance des bactéries.
- b) L'utilisation de l'isotope radioactif ^{35}S .
- c) L'influence de la nature de la source de soufre sur la synthèse des acides aminés soufrés.

I. GENERALITES : SOUCHE UTILISEE - MILIEU DE CULTURE - MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

A. Souche

Nous avons utilisé la même souche de colibacille (*E. coli*) que nos prédécesseurs au Laboratoire de Chimie. Les caractères de cette souche ont été décrits dans la thèse de POUTEAU-THOUVENOT (42). Cette souche sera appelée par nous *E. coli* N. Nous avons utilisé également deux souches dérivées de cette dernière, et rendues résistantes à des concentrations de 5 g de sulfanilamide par litre (*E. coli* SA 5)

et de 10 g par litre (*E. coli* SA 10). Le mode d'obtention de ces souches résistantes a été décrit dans la thèse de PIERFITTE (40). Les souches résistantes obtenues présentent ce caractère définitivement et le conservent aussi bien après culture sur milieu gélosé non sulfamidé durant un mois, qu'après de nombreuses cultures répétées en milieu glucose-sels minéraux, non sulfamidé.

B. Milieu de culture

Le milieu de culture que nous employons dans nos expériences est un milieu liquide synthétique dépourvu de substances à propriétés antisulfamides. Certains produits en effet, tels que peptones ou des acides aminés sont doués d'un pouvoir antisulfamide. (TABONNE et coll. (62)). La présence de telles substances dans un milieu renfermant de la sulfamilamide serait naturellement inadéquate.

La formule de ce milieu est la suivante :

Phosphate disodique $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$, $12\text{H}_2\text{O}$	15 g
Phosphate monopotassique PO_4KH_2	3 g
Chlorure de sodium ClNa	3 g
Chlorure d'ammonium ClNH_4	2 g
Solution mère de SO_4Na_2 et Cl_2Mg	20 ml
Glucose	10 g
Eau distillée Q.S.p	1 litre

La formule de la solution mère est :

Sulfate de sodium anhydre SO_4Na_2	5,80 g
Chlorure de magnésium Cl_2Mg , $6\text{H}_2\text{O}$	4,20 g
Eau distillée Q.S.p	1 litre

Ce milieu renferme 24 μg de soufre sous forme de sulfate de sodium par ml. Il est directement dérivé du milieu C de ROBERTS (46) et présente un pouvoir tampon élevé qui favorise la croissance bactérienne .

Ce milieu peut être additionné pour certaines expériences de 5 g de sulfanilamide par litre (milieu SA 5) ou 10 g par litre (milieu SA 10) . La dissolution de la sulfanilamide est obtenue par léger chauffage du milieu . La stérilisation est réalisée à l'autoclave à 107° pendant une demi-heure afin d'éviter une altération du glucose . La croissance de *E. coli* dans ce milieu s'effectue de façon homogène, formant une suspension dont la densité optique (D.O.) peut être mesurée de façon satisfaisante .

C . Méthodes de culture

Les souches de *E. coli* N , *E. coli* SA 5 et *E. coli* SA 10 sont entretenues par repiquages réguliers tous les mois sur le milieu solide non sulfamidé de formule :

Gélose	20 g
Peptone	20 g
Glucose	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée Q.S.p	1 litre

Le milieu est réparti dans des tubes à essais de 18 x 180 mm et stérilisé à 110° C pendant une demi-heure . Les tubes sont alors abandonnés au refroidissement en position inclinée . Lesensemencements sont réalisés au moyen d'une anse de platine . Après 24 heures de culture à 37° C les tubes sont placés à la glacière à + 4° C pour leur conservation .

Pour les repiquages de routine nous utilisons le milieu liquide décrit précédemment réparti à raison de 10 ml dans des tubes de 18x180 mm . Lesensemencements sont réalisés au moyen de 0,2 ml d'une culture qui présente une D.O. de 20 . La fermeture du tube est assurée par un capuchon d'aluminium selon BONNEL (4) .

Pour réaliser nos diverses expériences nous avons utilisé des fioles d'Erlenmeyer de 100 ml contenant 60 ml de milieu . Chaque fiole porte une tubulure latérale qui permet une mesure directe de la densité optique de la culture . On évite ainsi les perturbations dans la croissance des bactéries que provoqueraient des prélèvements répétés . la mesure de D.O. pouvant être effectuée très rapidement .

Nous avons également pratiqué des cultures en ballons de diverses capacités

Qu'il s'agisse d'erlenmeyers ou de ballons nous avons toujours soumis nos cultures à une aération durant toute la durée de la croissance des bactéries . Cette aération a pour but d'augmenter la croissance bactérienne (40). A cet effet, les fioles et ballons sont fermés par un bouchon de caoutchouc traversé par deux tubes de verre dont l'un plonge dans le milieu . Les extrémités externes de ces tubes de verre sont obturées au moyen d'un tampon de coton cardé . Le tube qui ne plonge pas au sein du milieu est relié à une trompe à vide . L'autre tube est relié à un flacon barboteur contenant de l'eau distillée . Ce barboteur d'une part permet d'éviter les contaminations du milieu par les germes de l'air , d'autre part empêche une concentration du milieu par entraînement de vapeur d'eau, le courant d'air traversant le milieu étant déjà un débit d'environ 100 bulles par minute .

Les cultures sont réalisées à l'étuve à 37°C . Le mode d'inoculation des ballons de milieu a été standardisé : à 10 ml de milieu nous ajoutons 0,2 ml d'une culture de bactéries âgées de 12 à 18 heures, ramenée à la D.O. de 20 . C'est ce que nous appellerons dans la suite inoculum standard .

D . Mesure de la croissance

Pour mesurer la croissance des bactéries en milieu liquide nous avons suivi les variations de la D.O. et déterminé le poids sec de prises d'essai de D.O. connue . Les D.O. sont mesurées avec un spectrophotomètre Coleman junior à la longueur d'onde de 610 mμ en tube calibré de 19 . 250 mm .

La D.O. est exprimée en centièmes de D.O. , après soustraction de la D.O. initiale .

Le poids sec est déduit de la mesure de la D.O. de suspensions de bactéries lavées à l'eau distillée . Pour faire cette détermination, nous avons réalisé l'expérience suivante :

Nous partons d'une culture de 12 heures de E. coli en ballon avec aération . Les bactéries sont récoltées par centrifugation puis lavées deux fois à l'eau distillée, afin d'éliminer toute trace de sels pouvant fausser les pesées ultérieures . Le culot bactérien obtenu est repris dans l'eau distillée .

Nous obtenons ainsi une suspension à partir de laquelle nous réalisons par dilution des suspensions filles de D.O. décroissante . De chacune des suspensions, nous prélevons 5 ml que nous plaçons dans un vase à tarer du poids connu . Nous évaporons à sec à 100° jusqu'à poids constant . Nous obtenons après pesée le poids sec correspondant à 5 ml de suspension de bactéries de D.O. connue .

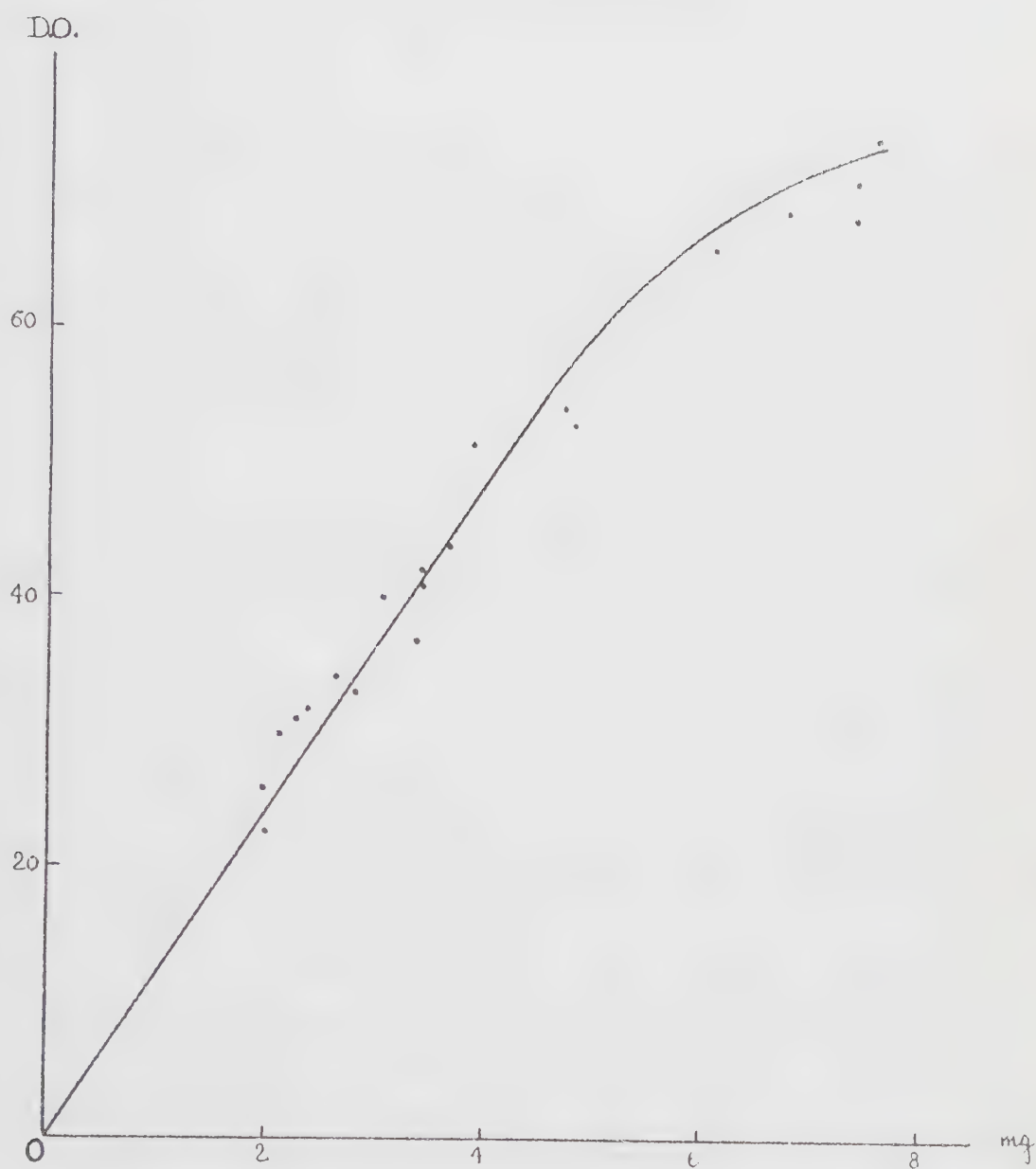
Les résultats de cette expérience sont reportés sur le graphique n° 1 , et le tableau n° 1 .

Tableau n° 1

Rapport entre D.O. et poids sec (en mg) de 5 ml d'une suspension de E. coli

D.O.	23	26	30	31	32	33	34	37	40	41	42
Poids sec	2,00	1,92	2,12	2,28	2,37	2,80	2,65	3,40	3,05	3,45	3,46
D.O.	44	51	53	54	66	68	69	71	74	78	
Poids sec	3,68	3,90	4,80	4,75	6,10	7,44	6,82	7,40	7,60	9,22	

Nous constatons qu'il y a corrélation linéaire entre D.O. et poids sec à condition de se placer à une D.O. inférieure à 60 . Ces résultats correspondent sensiblement à ceux de PIERFITTE (40) . Dans ces conditions nous avons donc pu comparer nos diverses expériences en exprimant la croissance en D.O. Nous avons ainsi pu éviter les déterminations du poids sec des prélèvements de bactéries et nous rapportons tous nos résultats à l'unité de D.O. , par conséquent toujours à une même masse de bactéries .



Graphique n° 1

Rapports entre D.O. et poids sec de 5 ml de suspension
de bactéries dans de l'eau distillée .

II . UTILISATION DE L'ISOTOPE RADIOACTIF ^{35}S

A . MILIEU RADIOACTIF UTILISE - MESURE DE LA RADIOACTIVITE ET RECOLTE DES BACTERIES

a) Milieu

ROBERTS et coll. (46) ont montré qu'après culture le soufre capté par les bactéries ne se retrouve que dans un nombre assez limité de constituants bactériens. Les composés soufrés synthétisés par E. coli sont en effet assez peu nombreux comme nous le verrons plus loin : on retrouve principalement de la méthionine, de la cystéine et du glutathion. Si donc nous réalisons un milieu de culture contenant du sulfate de sodium radioactif ($^{35}\text{SO}_4\text{Na}_2$) la fixation de ^{35}S par E. coli au cours de sa croissance dans ce milieu sera relativement aisée à suivre. Il suffira en effet d'enregistrer au moyen d'un dispositif approprié la radioactivité des bactéries au cours de leur croissance. D'autre part on ne retrouvera de radioactivité que dans les fractions bacillaires renfermant des acides aminés soufrés. Le nombre de ces acides aminés étant assez restreint, leur identification s'en trouve facilitée.

^{35}S est un nuclide émettant un rayonnement bêta mou d'énergie égale à 0,168 million d'électron-volt (Mev). Cette faible énergie le rapproche de l'isotope le plus fréquemment utilisé dans le domaine de la biologie le ^{14}C , d'énergie égale à 0,155 Mev. La période de ^{35}S est de 87 jours, elle est suffisamment longue pour ne pas nécessiter de corrections dues à la décroissance de la radioactivité dans des expériences de courte durée.

Nous avons utilisé du sulfate de sodium marqué au soufre (S^*) et de la méthionine marquée également sur l'atome de soufre (M^*), fournis par le Commissariat à l'Energie atomique, département des radioéléments, à Gif-sur-Yvette. Ces produits sont mis en solution dans l'eau distillée et dilués en fonction de la radioactivité que l'on désire introduire dans les milieux d'expérience. Il faut toutefois tenir compte du fait que dans nos conditions expérimentales nous ne pouvons enregistrer que 5 % de l'activité spécifique en raison de l'efficacité de notre système de comptage.

Les solutions radioactives sont stérilisées séparément et ajoutées dans les milieux stériles juste avant leur inoculation. L'addition de ces solutions aux milieux de culture apporte un excédent négligeable de sulfate ou de méthionine.

b) Mesures de radioactivité

Pour déterminer la radioactivité de nos prélèvements de bactéries nous avons le choix entre plusieurs techniques . Certains auteurs préconisent une destruction préalable des échantillons par oxydation afin de transformer le soufre organique en sulfate minéral (29) (13) (66) (28) . Ce dernier est ensuite isolé par précipitation sous forme de sulfate de baryum ou de sulfate de benzidine en s'aidant d'un entraîneur . Le précipité est recueilli sur des disques de papier filtre qui sont ainsi utilisés pour mesurer la radioactivité . Ces méthodes sont d'un emploi délicat et conviennent mal pour des déterminations répétées en grand nombre , comme il est nécessaire de la faire en biologie . Aussi la plupart des auteurs déterminent-ils directement la radioactivité de leurs échantillons sans leur faire subir de minéralisation préalable . Il faut toutefois réaliser des suspensions avec ces échantillons afin de les répartir de façon homogène sur un support approprié . Ainsi le plus souvent les suspensions sont-elles placées sur des cupules puis séchées . C'est ce procédé que nous avons adopté .

Nos échantillons sont constitués par des suspensions bactériennes dans l'eau que nous plaçons sur des cupules en aluminium de 29 mm de diamètre . Le contenu de chaque cupule est additionné d'une goutte de solution commerciale de "teepol" dilué au 1/100 . Ce tensioactif permet d'obtenir une répartition uniforme des dépôts sur le fond de la cupule . En effet , les forces de tension superficielle qui entrent en jeu lors de la dessiccation tendent à faire remonter les particules de la suspension sur le bord de la cupule . L'addition du tensioactif diminue cet effet .

Les cupules sont placées sur platine chauffante à 100° jusqu'à poids constant et conservées dans un dessiccateur sur P_2O_5 , la mesure de la radioactivité d'un rayonnement bêta mou ne pouvant s'effectuer que sur des dépôts parfaitement secs . Une épaisseur de 0,1 mm d'eau suffit en effet pour arrêter une fraction appréciable des rayons bêta de ^{35}S .

La radioactivité de nos échantillons a été mesurée sous un compteur Geiger-Müller . Nous avons utilisé un tube TGC 2 Tracerlab , couplé à une échelle Mesco RPN 3 et à un passeur automatique d'échantillons PAEL Mesco .

Le tube présente une fenêtre mince de mica de $1,7 \text{ mg/cm}^2$ afin de n'arrêter que le moins possible de rayonnement .

Pour la mesure de la radioactivité certaines précautions doivent être respectées . Tout d'abord en ce qui concerne la géométrie dans les mesures : il est néces-

saire d'opérer toujours dans les mêmes conditions : taille des cupules , répartition homogène des suspensions , distance de l'échantillon à la fenêtre du compteur (22) .

La nature de la cupule intervient car elle réfléchit le rayonnement émis . Cet effet ou rétrodiffusion est faible avec les cupules en Al (52) .

De même la présence de sels minéraux en quantité trop importante dans les échantillons augmente la radioactivité apparente , c'est le "self scattering" (51) .

Enfin, le poids lui-même de l'échantillon a une grande importance quand il s'agit de ^{35}S car la matière absorbe une partie du rayonnement, c'est la "self-absorption" . Aussi dans nos expériences les dépôts sont calculés de telle sorte qu'il n'y a pas lieu de faire de correction pour cette absorption . Le poids doit être inférieur à 4 mg uniformément répartis sur les $6,6\text{ cm}^2$ de la cupule .

De plus à chaque mesure de radioactivité il est nécessaire de retrancher le mouvement propre du compteur, dû à la radioactivité ambiante . Dans notre cas, ce bruit de fond est de 25 coups par minute . Cette valeur a donc été retranchée de toutes les mesures effectuées .

En ce qui concerne la précision du comptage, nous comptons en général 3 000 désintégrations . Or, étant donné que si N est le nombre de coups enregistrés, l'erreur moyenne pour cent est donnée par $100/\sqrt{N}$, nos mesures de radioactivité sont donc réalisées avec une précision statistique de $\pm \frac{100}{\sqrt{3\ 000}} = \pm 2\%$ environ .

Tous nos résultats correspondent à la moyenne de 3 mesures effectuées sur 3 échantillons semblables .

c) Récolte des bactéries

Au cours de nos expériences nous avons utilisé deux procédés de récolte des bactéries : la centrifugation et la filtration sur membrane .

1) Centrifugation

Les suspensions de cellules dans leur milieu de culture sont prélevées et placées dans des tubes à centrifuger en verre de 30 ou 100 ml suivant le volume du prélèvement . Les tubes sont alors centrifugés pendant 20 minutes à 6 000 tours minute à $+4^{\circ}\text{C}$ dans une centrifugeuse JOUAN, type C 53 . Le liquide surnageant est décanté à l'aide d'un siphon d'Ambard relié à une trompe à vide . Comme nos milieux sont radioactifs, cette opération doit être menée avec un soin tout particulier

afin d'éviter la contamination du laboratoire par des souillures radioactives . Le culot bactérien est alors remis en suspension dans un volume d'eau distillée égal au volume initial du prélèvement et ainsi lavé deux fois de suite par centrifugation à $+4^{\circ}\text{C}$. Ces lavages éliminent en particulier les sels minéraux qui comme nous l'avons vu sont gênants quand on désire par la suite effectuer des mesures de radioactivité . D'autre part, nous avons vérifié que ces lavages sont suffisants pour éliminer toute la radioactivité qui n'est pas fixée dans les bactéries . Les lavages ne peuvent d'ailleurs pas être poursuivis un trop grand nombre de fois car les bactéries supportent mal un traitement prolongé par l'eau distillée et deviennent difficiles à séparer de la suspension par centrifugation . Un traitement prolongé à l'eau distillée risque d'autre part d'extraire certains acides aminés du cytoplasme (58) .

Dans le cas où nous employons le milieu SA 10 , il est nécessaire d'effectuer la première centrifugation à la température ordinaire car à froid la sulfanilamide précipiterait et il serait ensuite très difficile de l'éliminer .

Le culot bactérien finalement obtenu est remis en suspension dans un volume déterminé d'eau distillée . La suspension obtenue est soigneusement homogénéisée . Trois échantillons d'un même volume de suspension sont alors prélevés et placés sur cupule pour détermination de la radioactivité . La mesure donnera la radioactivité des bactéries totales = RAT .

2) Filtration sur membrane

Dans certaines expériences, nous avons voulu suivre l'incorporation du sulfate dans les bactéries en faisant des prélèvements de culture à des intervalles de temps très rapprochés . Dans ce cas, la récolte par centrifugation s'avérait mal adaptée car trop longue . Nous avons donc utilisé une technique de récolte par filtration sur membrane . Nous avons employé l'appareil et les membranes "Millipore", type H.A. (dimension des pores $0,45\ \mu$ - diamètre des membranes 47 mm) .

La filtration est accélérée en s'aidant du vide créé par une trompe à eau . La suspension bactérienne est alors placée sur la membrane et lavée deux fois avec 50 ml d'eau distillée pour éliminer les sels minéraux et la radioactivité non fixée par les bactéries . La filtration est rapide pour des suspensions dont la densité optique ne dépasse pas 40 . Au delà de cette valeur les filtrations deviennent assez lentes .

La membrane est ensuite sortie de l'appareil, lavée à deux reprises avec 1 ml d'eau distillée en s'aidant d'un petit agitateur aplati à une extrémité, de façon à entraîner toutes les bactéries qui forment une mince pellicule sur la surface de la

membrane ; la suspension obtenue est recueillie quantitativement sur cupule pour mesure ultérieure de la radioactivité totale des bactéries .

B . EXTRACTION FRACTIONNEE DES BACTERIES

La détermination de la fixation totale du soufre par les bactéries ne donne d'information que sur l'ensemble de l'activité métabolique des cellules . Pour étudier plus finement la distribution du traceur dans les différentes classes de composés soufrés présents chez *E. coli*, nous avons utilisé une méthode de fractionnement chimique des cellules . La technique que nous avons suivie est directement dérivée de la méthode d'extraction des acides nucléiques de SCHNEIDER (50) (46) .

Un volume de culture bactérienne est additionné d'un volume de solution d'acide de trichloracétique (TCA) à 20 % froid (+ 4°C) . La suspension est abandonnée à + 4°C durant au moins deux heures . Nous extrayons ainsi la fraction acidosoluble à froid . Le résidu protéique est ensuite séparé de la solution acide par centrifugation ou filtration sur membrane millipore . Ce précipité est lavé deux fois de suite à l'eau distillée afin d'éliminer toutes traces de TCA . Ce traitement avec TCA extrait principalement le glutathion des cellules (46) . Le seul contact de deux heures avec TCA 10 % est suffisant pour extraire la totalité du glutathion des bactéries car un second traitement avec cet acide n'entraîne plus aucune radioactivité . Le culot protéique restant qui constitue les protéines bactériennes pourra être utilisé pour la chromatographie après hydrolyse, ou pour déterminer la radioactivité incorporée dans les protéines . Dans ce dernier cas, le culot protéique sera remis en suspension dans l'eau distillée et cette suspension rendue homogène placée sur cupule à raison de 1 ml par cupule afin de déterminer la radioactivité des protéines = RAP .

Nous n'avons pas jugé nécessaire d'effectuer des traitements par l'alcool à 45°C, puis par TCA 5 % à 100°C comme le font ROBERTS et coll. (46) . En effet, le traitement à l'alcool n'entraîne qu'une faible proportion de la radioactivité . De plus cette fraction alcoolo-soluble est constituée par des protéines pour lesquelles la distribution du soufre entre cystéine et méthionine est la même que dans les protéines alcoolo-insolubles . En ce qui concerne la fraction soluble dans TCA à chaud, elle contient les acides nucléiques . Sa radioactivité est due à la fixation du soufre sur les s. ARN (71) et elle est particulièrement faible (46), de sorte que nous pouvons la négliger .

III . INFLUENCE DE LA NATURE SOUS LAQUELLE LE SOUFRE SE TROUVE DANS LE MILIEU SUR LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINES SOUFRES

Avant d'exposer l'étude comparée du métabolisme soufré chez nos trois souches de colibacilles, nous envisagerons d'abord le mécanisme de la synthèse de la méthionine et de la cystéine chez *E. coli* N lorsque nous lui fournissons différentes sources de soufre .

A . NATURE DES SOURCES DE SOUFRE FOURNIES A *E. COLI* DANS NOS EXPERIENCES

ROBERTS et coll. (46) ont étudié le métabolisme soufré chez *E. coli* . Ils ont montré que la quantité de soufre sulfate (26 $\mu\text{g}/\text{ml}$) apportée par le milieu qu'ils appellent C était largement suffisante pour permettre une croissance optimale de *E. coli* dans ce milieu . Le soufre assimilé par les bactéries se trouve principalement (95 %) sous forme de glutathion, de cystéine et de méthionine ; la méthionine ne se trouvant que dans les protéines et la cystéine étant répartie également entre glutathion et protéines . En utilisant un milieu de culture renfermant du S^* ces trois corps se retrouveront donc marqués .

Pour nos travaux nous avons utilisé une méthode de compétition isotopique inspirée des travaux de ces auteurs .

Si on ajoute de la méthionine au milieu de culture, on constate que cet acide aminé est assimilé directement par les bactéries pour se retrouver uniquement dans les protéines bactériennes . La présence de méthionine dans le milieu de culture inhiberait la synthèse de cet acide aminé par un phénomène de répression enzymatique (67) (47) (48) . On peut donc penser qu'en présence de méthionine, les bactéries préfèrent subvenir à leurs besoins en cet acide aminé en incorporant la méthionine fournie par le milieu de culture .

Si on ajoute de la cystine au milieu de culture, on constate que cet acide aminé est incorporé sous forme de cystéine, non seulement dans les protéines bactériennes, mais également dans les autres fractions soufrées des constituants bactériens (en particulier glutathion) . Il est nécessaire d'utiliser de la cystine et non pas de la cystéine car ce dernier acide aminé inhibe la croissance des bactéries, même en présence de sulfate comme autre source de soufre . Cette inhibition n'est que temporaire et sa durée correspond au temps nécessaire à l'oxydation de la cystéine

en cystine (46) . Il est donc préférable dans le type d'expériences que nous envisageons d'ajouter dans le milieu de la cystine plutôt que de la cystéine .

Nous avons réalisé nos expériences en divers milieux renfermant soit du sulfate marqué (milieu S^*), soit du sulfate marqué et de la DL-méthionine non marquée (milieu $S^* + M$), soit du sulfate non marqué et de la DL-méthionine marquée (milieu $S + M^*$), soit du sulfate marqué et de la L cystine non marquée .

B . HYDROLYSE ET CHROMATOGRAPHIE

Afin d'étudier l'incorporation de la méthionine dans les protéines bactériennes, nous avons hydrolysé les protéines bactériennes obtenues selon la méthode de SCHNEIDER (50), puis nous les avons soumises à l'analyse chromatographique . Enfin nous avons étudié la répartition de la radioactivité le long des chromatogrammes obtenus .

L'hydrolyse des protéines est réalisée avec HCl 6 N, durant 14 heures à 100°C en tube scellé . Après filtration HCl est éliminé par évaporation au bain-marie répétée 3 fois de suite, après reprise par l'eau distillée . Le résidu est alors dissous dans quelques gouttes d'eau distillée et soumis à la chromatographie descendante sur papier Wathman n° 1 pendant 10 heures .

Nous utilisons le solvant de CLAYTON et STRONG (8) : méthyléthylcétone/ acide propionique/eau (75/25/30 V/V) . Ce solvant migre assez rapidement . En 10 heures, il a parcouru toute la longueur de la feuille de papier, soit 30 cm . Après développement du chromatogramme, les acides aminés sont révélés à la ninhydrine (solution à 0,25 % dans le butanol) pendant 10 minutes à 80° et identifiés à l'aide de témoins déposés sur le papier au voisinage des hydrolysats protéiques, avant de pratiquer la chromatographie .

Il existe des techniques spéciales de révélation des composés soufrés sur les chromatogrammes (26) . Ces réactifs ne nous sont pas apparus supérieurs à la ninhydrine pour les renseignements que nous désirions obtenir .

Nous avons dû utiliser des témoins d'acides aminés traités dans les mêmes conditions que les protéines à analyser ; c'est-à-dire hydrolyse par HCl 6 N en tube scellé à 100° suivi d'évaporations répétées au bain-marie . En effet, les traitements à HCl 6 N et les évaporations qui suivent, entraînent une oxydation des acides aminés

soufrés . La cystéine est ainsi transformée en acide cystéique (46) . La méthionine fournit plusieurs composés de Rf différents : méthionine-sulfoxyde , méthionine-sulfone et acide homocystéique . Dans certains cas , il reste même de la méthionine intacte . De plus les proportions respectives des divers composés obtenus ne sont pas constantes d'une hydrolyse à l'autre . Pour limiter l'oxydation de la méthionine au cours de l'hydrolyse , on peut opérer en présence d'acide formique et pratiquer les évaporations successives sous vide (65) .

Nous avons également tenté d'éviter l'oxydation en neutralisant l'hydrolysats avant évaporation par l'ammoniaque . Mais on obtient un résidu gênant de chlorure d'ammonium duquel il est difficile d'extraire quantitativement les acides aminés . Cependant dans ce cas , la proportion de méthionine non altérée semble plus élevée .

Il serait également possible d'oxyder quantitativement la méthionine en méthionine-sulfone par traitement à l'eau oxygénée (12) . Cependant , cette oxydation tentée sur nos hydrolysats n'a jamais été quantitative . Nous obtenons toujours les trois dérivés d'oxydation de la méthionine . En définitive les hydrolyses ont donc été pratiquées sans précautions spéciales .

Une fois révéélé , le chromatogramme est découpé en bandes longitudinales de 2 cm de large afin de séparer les divers échantillons . Ces bandes sont fixées sur une feuille métallique rigide et on les fait défiler une à une sous le compteur Geiger . On a toutefois intercalé entre le tube TGC 2 et la bande de chromatogramme un cache en carton portant une fenêtre de 1 x 2 cm . Nous enregistrons ainsi à chaque mesure la radioactivité de 2 cm² de bande .

Il est à noter que le papier à chromatographie absorbe une quantité importante de la radioactivité . Il a donc été nécessaire de chromatographier un assez grand volume d'hydrolysats de protéines afin d'obtenir des chromatogrammes suffisamment radioactifs . Ceci entraîne une séparation assez grossière des produits d'hydrolyse . Ce fait peut expliquer que nous observons des traînées radioactives au lieu des spots radioactifs , correspondant aux acides aminés qui sont marqués .

C . VERIFICATION DE LA PURETE DU SULFATE UTILISE

ROBERTS et coll. (46) cherchant quelle était la meilleure source de soufre pour E. coli ont montré que le thiosulfate , le sulfite , la cystine , la méthionine et la méthylcystéine étaient utilisés préférentiellement au sulfate et pouvaient servir com-

me seule source de soufre . Par conséquent, si le sulfate utilisé contient des traces d'ions provenant de la réduction des sulfates, tels que SO_3^{--} par exemple, les expériences pourront être entachées d'erreur . En effet, la radioactivité fixée sera augmentée si c'est le sulfate marqué qui est contaminé par du sulfite marqué ; par contre, elle sera diminuée si c'est le sulfate marqué qui est contaminé par du sulfite non marqué . Par conséquent, il est nécessaire de vérifier que le sulfate que nous utilisons était bien exempt de ces contaminations . Pour cela, nous avons réalisé des cultures de E. coli N dans des milieux contenant du sulfate marqué en quantité calculée pour obtenir une radioactivité de 6 000 coups par minute par ml de milieu (c/min/ml), dans l'une des fioles et 3 000 c/min/ml dans l'autre . D'autre part, l'un des milieux renferme 26 μg de S sulfate par ml, l'autre 13 μg de S sulfate par ml . Nous avons alors déterminé la teneur en soufre de nos bactéries . Dans ces conditions si notre sulfate est exempt d'impuretés gênantes, nous devrions obtenir une teneur en S total incorporé identique, que le milieu soit à 26 μg de S ou à 13 μg de S . C'est en effet le cas, aux erreurs expérimentales près, comme nous pouvons le constater dans le tableau n° 2 .

Tableau n° 2

RA du milieu par ml	Poids sec du prélèvement en mg	RA de 1 mg de bactéries	RA des protéines de 1 mg de bactéries	ug de S/mg de bactéries	ug de S/mg de protéines de 1 mg bactéries
Milieu à 26 μg de S sulfate par ml					
3030	0,84	647	554	5,5	4,7
6290	0,775	1329	1171	5,4	4,8
Milieu à 13 μg de S sulfate par ml					
3030	0,877	1365	1143	5,54	4,9
6290	1,08	2671	2325	5,51	4,8

La même quantité de traceur a été ajoutée dans les deux milieux .

Nous trouvons cependant une teneur en soufre (5,6 mg/g inférieure à celle trouvée par ROBERTS (46) (11,2 mg/g de poids sec), mais nous n'avons pas utilisé la même souche que cet auteur .

CHAPITRE II

ORIGINE DU SOUFRE DES PROTEINES DE E. COLI SUIVANT LA NATURE DU MILIEU DE CULTURE

Nous avons vu que le sulfate du milieu de culture est utilisé par E. coli pour synthétiser cystéine et méthionine . Nous nous sommes demandés si ces deux acides aminés seraient toujours synthétisés à partir du sulfate au cas où nous les additionnerions au milieu de culture . Nous étudierons donc successivement la culture en présence de méthionine , puis la culture en présence de cystéine .

I . MILIEU ADDITIONNE DE METHIONINE

Nous avons étudié la fixation de la méthionine d'une part en pratiquant des cultures en présence de cet acide aminé à différentes concentrations , ce qui nous a permis de présumer une incorporation de cet acide aminé dans les protéines bactériennes , d'autre part en réalisant une analyse chromatographique des protéines de bactéries ayant poussé en présence de méthionine , ce qui nous a donné la preuve de cette incorporation .

A . Cultures en présence de méthionine

Nous avons réalisé ces cultures en milieu contenant du sulfate marqué additionné de méthionine non marquée . Certaines fioles servant de témoins ne contenaient pas de méthionine . La concentration de chaque fiole en sulfate et méthionine est indiquée dans les tableaux n° 3 et n° 3 bis . Les prélèvements bactériens ont été effectués au cours de la phase logarithmique de croissance (8 h) et en fin de croissance (11 h) .

La radioactivité spécifique contenue dans chaque fiole croît en proportion inverse de la concentration en sulfate dans le milieu . En effet, la quantité de traceur $^{35}\text{SO}_4^{--}$ ajoutée dans chaque fiole est la même , mais les quantités de sulfate non radioactif ajoutées diffèrent d'une fiole à l'autre . Ainsi, la radioactivité spécifique de chaque milieu est d'autant plus élevée qu'il y a moins de sulfate non marqué dans le milieu .

Tableau n° 3

E. coli N. Prélèvement après 8 heures de culture . Influence du rapport S méthionine/S^{*} sulfate sur l'incorporation du S dans les bactéries . Toutes les fioles renferment la même quantité de traceur ³⁵S .

Fiole	Milieu	D.O.	RAT	RAP	$\frac{RAT}{D.O.}$	$\frac{RAP}{D.O.}$	$\frac{RAP}{RAT}$
A	(1) 26 µg S [*]	30	2 325	1 755	78	59	0,76
B	(1) 26 µg S [*] + 26 µg M	31	805	475	26	15,5	0,60
C	26 µg S [*] + 52 µg M	35	900	595	25,7	16,7	0,65
C'	26 µg S [*] + 52 µg M	30	770	475	25,7	15,9	0,62
D	26 µg S [*] + 104 µg M	40	1 075	702	26,8	17,6	0,66
D'	26 µg S [*] + 104 µg M	30	793	465	26,4	15,5	0,59
E	13 µg S [*]	37	5 520	4 137	150	112	0,75
F	13 µg S [*] + 26 µg M	33	1 645	1 020	50	31	0,62
F'	13 µg S [*] + 26 µg M	31	1 622	922	52,4	29,8	0,57
G	6,5 µg S [*]	33	10 000	7 525	304	228	0,75
H	6,5 µg S [*] + 26 µg M	34	3 025	1 915	89	56,4	0,63
H'	6,5 µg S [*] + 26 µg M	38	3 305	2 115	87	55,6	0,64

(1) Les teneurs en sulfate (S^{*}) et méthionine (M) sont calculées en µg de S par ml de milieu . RA en coup/min/ml .

Tableau n° 3 bis

E. coli N. Prélèvement après 11 heures de culture .

Légende : voir tableau n° 3 .

Fiole	Milieu	D.O.	RAT	RAP	$\frac{RAT}{D.O.}$	$\frac{RAP}{D.O.}$	$\frac{RAP}{RAT}$
A	26 µg S [*]	37	3 000	2 510	81	68	0,84
B	26 µg S [*] + 26 µg M	38	1 095	772	29	20	0,69
C	26 µg S [*] + 52 µg M	40	975	695	24,3	17,4	0,72
C'	26 µg S [*] + 52 µg M	39	932	650	24	16,7	0,70
D	26 µg S [*] + 104 µg M	42	1 142	822	27,2	19,6	0,72
D'	26 µg S [*] + 104 µg M	35	862	647	24,6	18,5	0,75
E	13 µg S [*]	45	7 025	5 900	156	130	0,83
F	13 µg S [*] + 26 µg M	39	1 977	1 277	50,5	32,7	0,65
F'	13 µg S [*] + 26 µg M	39	1 875	1 237	48	31,8	0,66
G	6,5 µg S [*]	43	11 847	10 000	264	232	0,88
H	6,5 µg S [*] + 26 µg M	40	3 625	2 250	90,5	56	0,62
H'	6,5 µg S [*] + 26 µg M	36	3 587	2 472	100	69	0,69

Les résultats qui figurent aux tableaux n° 3 et 3 bis nous permettent de constater les faits suivants :

a) Les quantités de S incorporé dans les bactéries sont plus faibles dans les fioles contenant de la méthionine que dans celles qui n'en contiennent pas ; ainsi dans la fiole B ($S^* + M$) $RAT/D.O. = 26$ alors que dans la fiole A (S^*) $RAT/D.O. = 78$. Par conséquent la méthionine non marquée ajoutée au milieu de culture s'est donc bien incorporée dans les protéines .

b) En comparant les fioles A, E et G, nous constatons que même avec 6,5 $\mu g/ml$ la croissance est normale ainsi que le montre la D.O. atteinte dans ces trois fioles . Le marquage est le même dans les 3 fioles, compte tenu des radioactivités spécifiques de S^* , RAP/RAT et la quantité de S incorporé sont identiques .

c) En comparant les fioles A, B, C, D, D' qui renferment les mêmes quantités de sulfate avec des quantités variables de méthionine, nous constatons que :

1 - La méthionine ajoutée ne modifie pas la croissance . Nous obtenons sensiblement la même D.O. dans toutes les fioles .

2 - Quelle que soit la quantité de méthionine ajoutée, $RAT/D.O.$, $RAP/D.O.$ et RAP/RAT restent du même ordre (fioles B, C, C', D, D') ; ceci confirme les résultats de ROBERTS et coll. (46) et montre que la méthionine fournie s'incorpore dans les protéines sans altérer la teneur des bactéries en glutathion et cystéine . Ces deux derniers composés sont marqués par le soufre fourni par $^{35}SO_4$, de la même façon, quelle que soit la quantité de méthionine fournie .

d) Dans les fioles F et F', l'addition de 26 μg de S méthionine, soit le double de la concentration du S sulfate, nous ramène au cas des fioles C et C' . Les rapports RAP/RAT sont comparables . Les rapports $RAT/D.O.$ et $RAP/D.O.$ sont identiques si on tient compte du fait que dans F et F' la radioactivité spécifique du S est double de celle des fioles C et C' .

e) Dans les fioles G, H et H' la radioactivité spécifique du S étant 4 fois plus élevée que dans la première série (A à D'), nous trouvons des valeurs de $RAT/D.O.$ et $RAP/D.O.$ sensiblement 4 fois plus fortes que dans les expériences homologues (fioles A, D et D'), ce qui indique que l'incorporation de S est bien du même ordre .

De même, les rapports RAP/RAT sont identiques à ceux trouvés dans les autres cas : ceci indique que la concentration réduite de SO_4^{--} est encore suffisante pour assurer la croissance normale de *E. coli*.

f) En comparant les valeurs RAP/RAT des prélèvements de 8 h et de ceux de 11 h, nous constatons qu'elles sont plus élevées en moyenne dans les cultures de 11 h (0,85 au lieu de 0,75 pour les fioles A, E et G). Cette diminution est due à une augmentation de la valeur de RAP s'expliquant probablement par le fait que les bactéries accumulent en fin de croissance des réserves protéiques comme l'a montré ROBERTS. Ces protéines contenant cystéine et méthionine en partie égale constituent la fraction alcool-soluble de ROBERTS et coll. (46). Ces réserves peuvent être utilisées comme source de soufre par les bactéries placées en milieu déficient en S.

B. Chromatographie des protéines

La chromatographie nous a également permis de confirmer l'incorporation directe de la méthionine ajoutée au milieu dans les protéines de *E. coli*.

Nous avons réalisé ces expériences en utilisant des protéines de bactéries ayant poussé en milieu S^* , $\text{S}^* + \text{M}$ et $\text{S} + \text{M}^*$. Nous allons rapporter les résultats de deux expériences réalisées avec des milieux renfermant deux concentrations différentes en méthionine.

a) Premier cas : le milieu de culture renferme 26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S à l'état de sulfate (marqué ou non) et 26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de S à l'état de méthionine (marquée ou non).

Les résultats obtenus sont consignés dans les figures n° 1 et 2 et les graphiques n° 2 et 3 qui correspondent à deux expériences semblables. Dans le cas de la figure n° 1 et du graphique n° 2 nous n'avons pas utilisé de méthionine marquée.

Nous constatons que dans le cas des bactéries qui ont poussé en milieu S^* le chromatogramme de l'hydrolysate protéique présente une radioactivité élevée dans les zones correspondant à la méthionine et à ses produits d'oxydation (graphiques 2 a et 3 a). Il en est de même pour les bactéries qui ont été cultivées sur milieu $\text{S} + \text{M}^*$ (graphique 3 c).

Par contre dans le cas des bactéries qui ont poussé en milieu $\text{S}^* + \text{M}$, la région du chromatogramme correspondant à la méthionine ne présente pas de radioactivité appréciable.

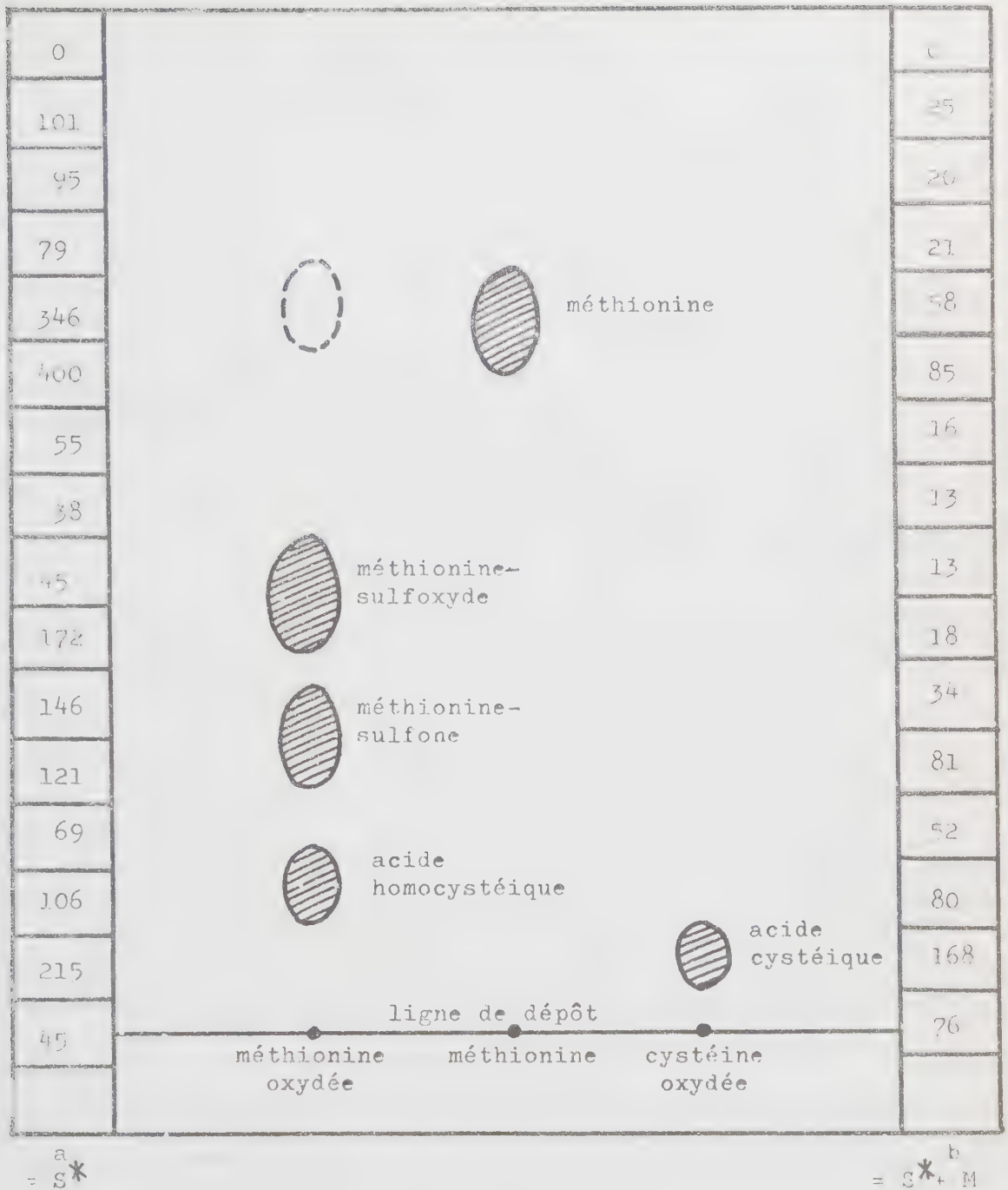
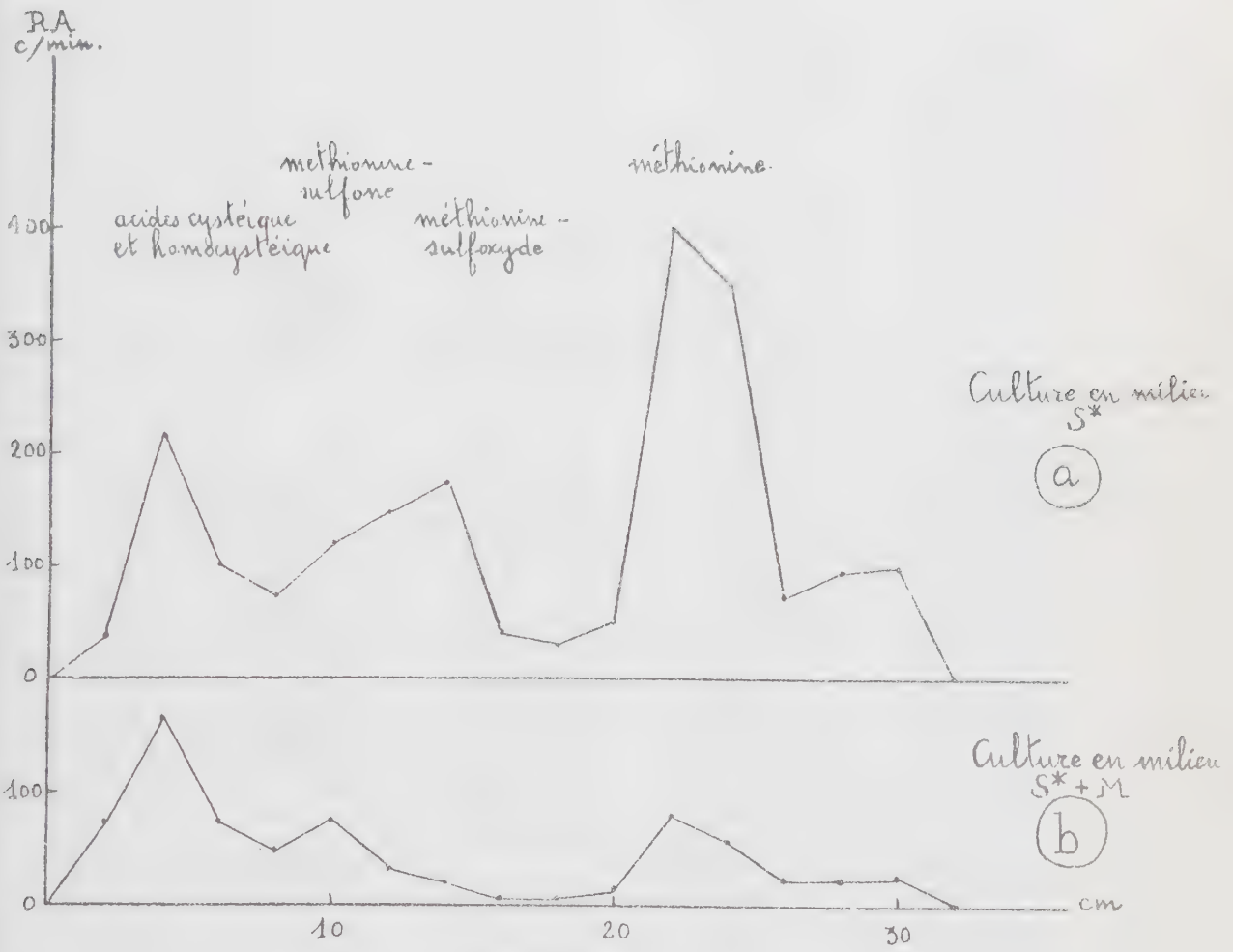


Figure n°1

Schéma indiquant: au centre la répartition chromatographique de la méthionine et de ses produits d'oxydation,
sur les côtés la répartition de la radioactivité (exprimée en c/min) sur des bandes où l'on a chromatographié des hydrolysats de bactéries cultivées en milieu S* (=a) et (S* + M =b).



Graphique n° 2

Courbes correspondant à la figure n° 1 et représentant la répartition de la radioactivité le long des bandes du chromatogramme. L'emplacement des témoins est indiqué dans le haut du graphique.

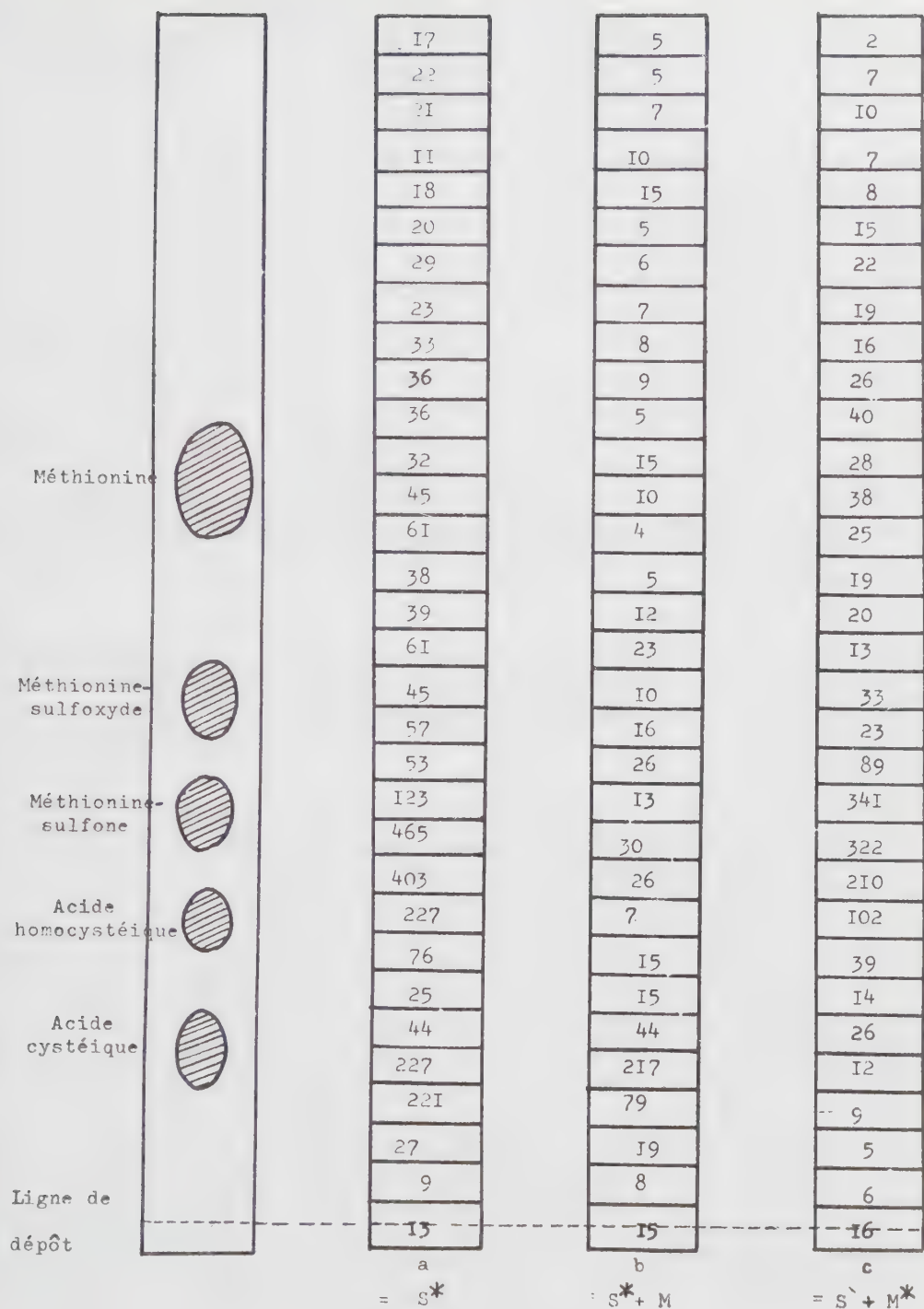
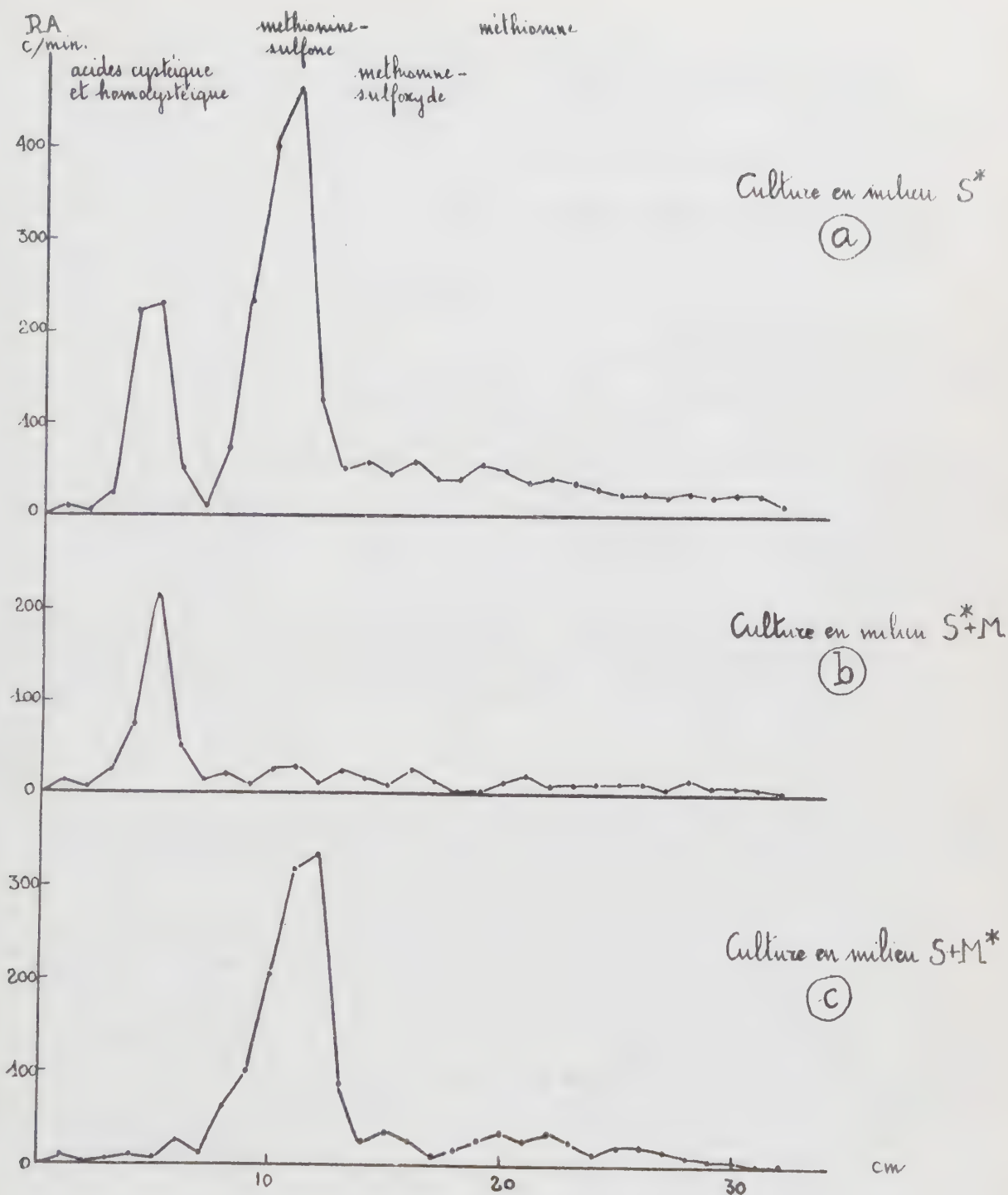


Figure n°2

Schéma indiquant : à gauche la répartition chromatographique de la méthionine et de ses produits d'oxydation; puis de gauche à droite la répartition de la radioactivité (en c/min) sur des bandes où l'on a chromatographié des hydrolysats de bactéries cultivées en milieu S*, S* + M et S + M* .
Teneur du milieu en soufre = 26 µg S/ml de chaque constituant.



Graphique n° 3

Courbes correspondant à la figure n° 2 et représentant la répartition de la radio-activité le long des bandes de chromatogramme. L'emplacement des témoins est indiqué dans le haut du graphique.

Teneur en soufre = 26 μ g S/ml de chaque constituant.

Notons cependant, dans le cas de la figure 1 a et du graphique 2 a, que la radioactivité due à la méthionine est répartie à la fois sur cet acide aminé et sur ses produits d'oxydation, alors que dans le cas des figures n° 2 a et 3 a et des graphiques n° 3 a et 4 a, cette radioactivité est essentiellement retrouvée sur la méthionine-sulfone. Ce fait illustre bien ce que nous disions plus haut au sujet de la difficulté de contrôler rigoureusement les conditions d'hydrolyse et d'oxydation des protéines (voir B : hydrolyse et chromatographie p. 23).

Nous pouvons donc conclure comme ROBERTS et coll. (46) que la méthionine fournie aux bactéries est incorporée dans les protéines préférentiellement au sulfate.

En ce qui concerne la cystéine, sur l'incorporation de laquelle nous reviendrons plus loin, nous pouvons également constater qu'elle est synthétisée à partir du sulfate du milieu et non pas à partir de la méthionine, dans le cas où celle-ci est présente dans le milieu. En effet, dans le cas des milieux S^* et $S^* + M$, nous notons une radioactivité accusée à l'emplacement de l'acide cystéique (graphiques n° 2 a et 2 b, 3 a et 3 b). Par contre, à ce même emplacement nous ne trouvons plus de radioactivité nette dans le cas des bactéries ayant poussé en milieu $S + M^*$ (graphique n° 2 c).

b) Deuxième cas : le milieu de culture renferme 5 $\mu\text{g/ml}$ de S à l'état de sulfate (marqué ou non) et 5 $\mu\text{g/ml}$ de S à l'état de méthionine (marquée ou non).

Cette série d'expériences avait pour but de déterminer si dans ce milieu à faible concentration en S (concentration néanmoins suffisante pour permettre une croissance optimale) l'incorporation de la méthionine ne se trouverait pas modifiée. On pouvait en effet penser que *E. coli* utiliserait le sulfate pour synthétiser de la méthionine par la voie normale au cas où cet acide aminé serait peu abondant dans le milieu de culture. Les résultats de ces expériences sont rapportés dans la figure n° 3 et le graphique n° 4.

Nous constatons que dans le cas d'hydrolysats de bactéries ayant poussé en milieu $S^* + M$, la zone correspondant à la méthionine et ses produits d'oxydation présente une radioactivité importante (graphique n° 4 b). Ceci ne devrait pas se produire si la quantité de méthionine fournie par le milieu de culture avait été suffisante pour subvenir à tous les besoins de *E. coli* en méthionine.

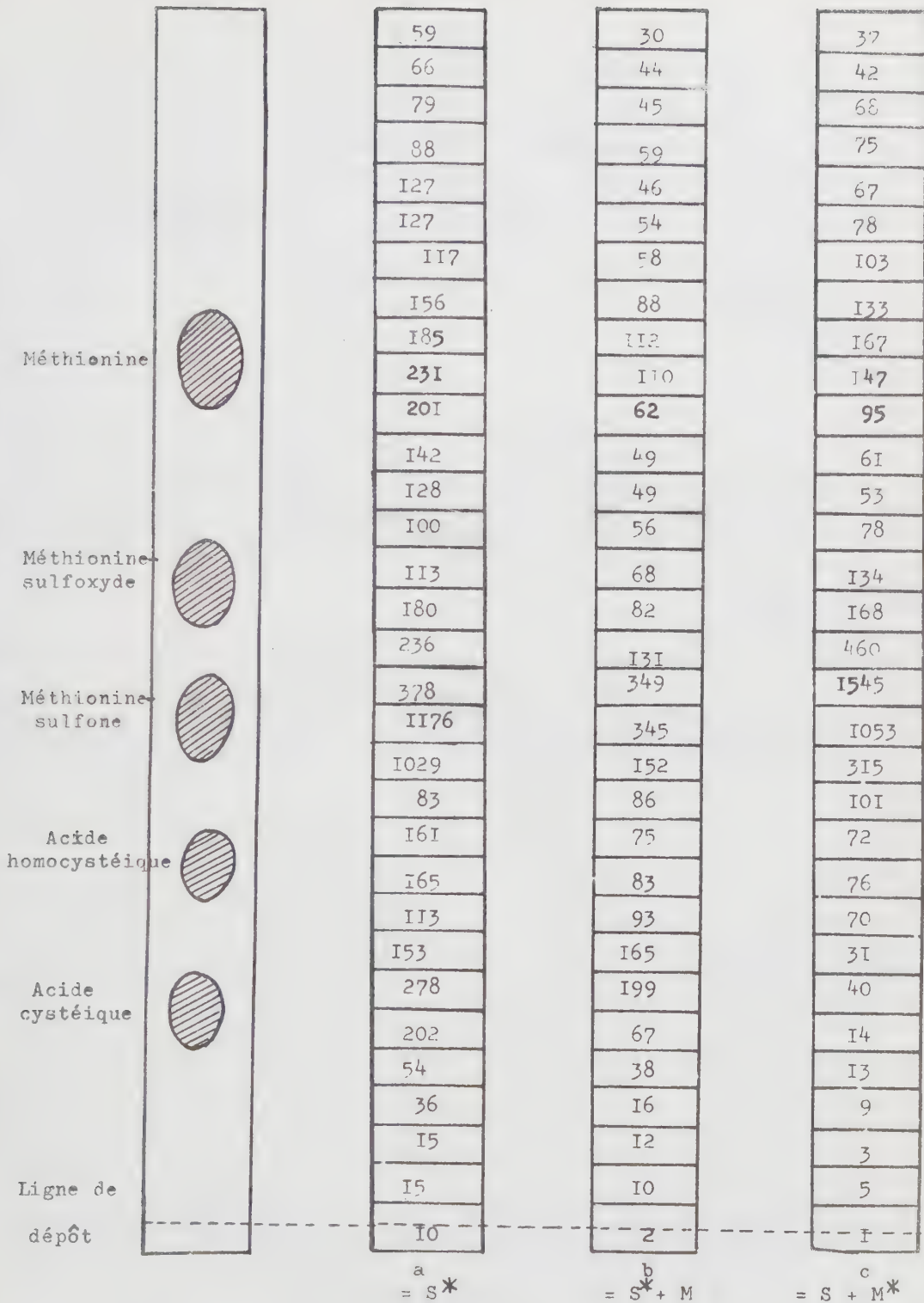
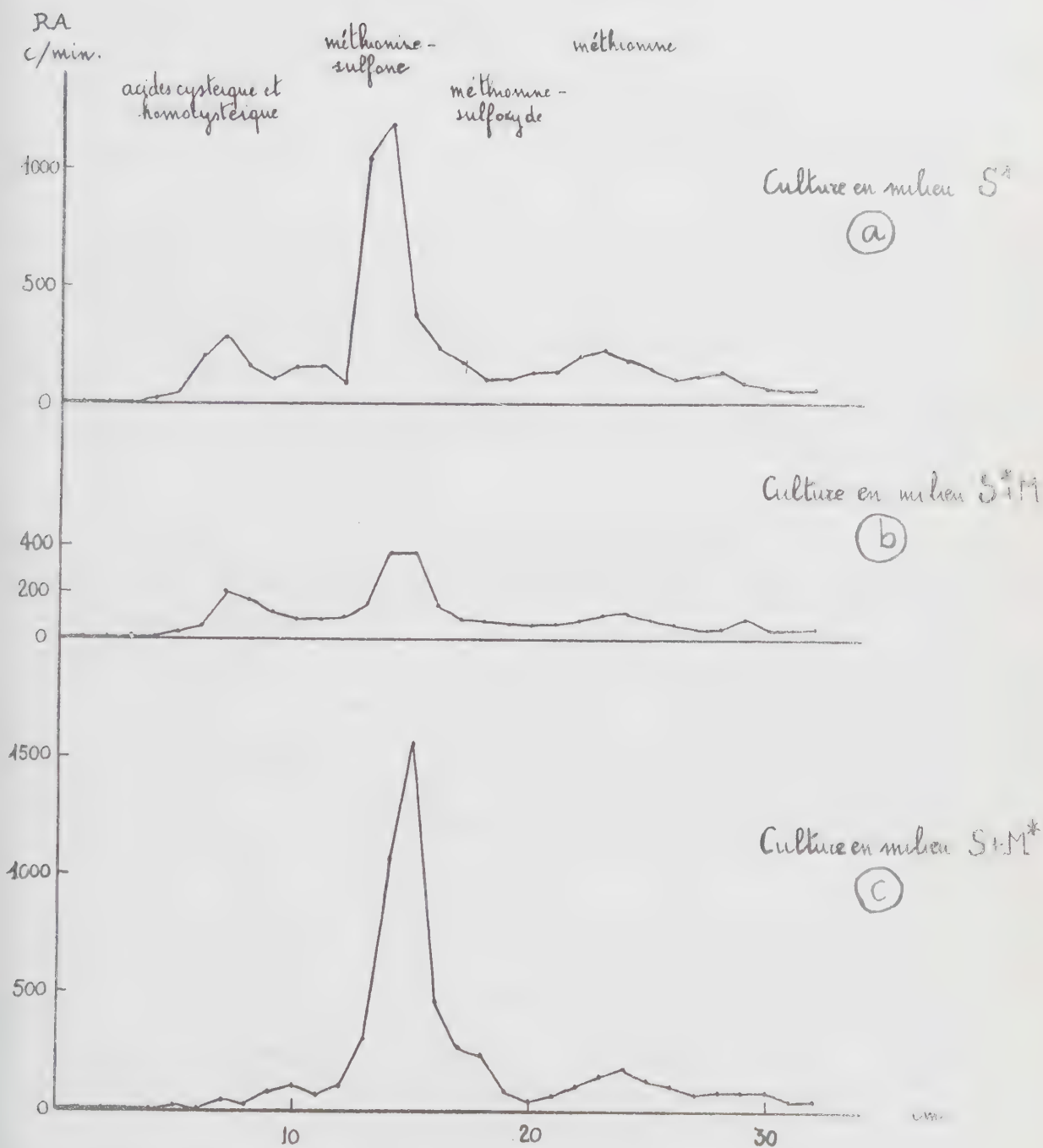


Figure n°3

Voir légende, figure n°2. Ici la teneur du milieu en soufre = 5 $\mu\text{g S/ml}$ de chaque constituant.



Graphique n° 4

Courbes correspondant à la figure n° 3. Voir légende, graphique n° 2.

Teneur en soufre = 5 µg S/ml de chaque constituant.

En effet, si la quantité de méthionine apportée par le milieu de culture n'a pas été suffisante pour suppléer aux besoins des bactéries en cet aminoacide, lorsque les bactéries ont épuisé le stock de méthionine mis à leur disposition, ou que le rapport des concentrations respectives en sulfate et méthionine s'est trouvé abaissé au-dessous d'une certaine valeur, les bactéries ont alors utilisé le sulfate mis à leur disposition pour synthétiser les aminoacides soufrés par la voie normale.

Nous en concluons qu'il est important d'ajouter de la méthionine à une concentration suffisante dans les milieux devant en contenir. Si cette concentration était trop faible, les bactéries fixeraient une certaine quantité de sulfate pour compenser le déficit en méthionine et les résultats obtenus seraient erronés.

La concentration de 26 μg de S méthionine par ml de milieu que nous utilisons est suffisante comme le prouvent la culture et la chromatographie.

II. MILIEU ADDITIONNE DE CYSTINE

Nous avons vu que cet acide aminé ne peut pas être assimilé directement par *E. coli* (ROBERTS (46)). Il doit lui être fourni sous forme de cystine. En effet, dans nos premières expériences, nous avons tenté d'utiliser des milieux additionnés de cystéine. Dans ce cas nous avons obtenu des bactéries qui présentaient une radioactivité assez importante, ce qui ne devrait pas se produire si la cystéine était utilisée comme seule source de soufre. En fait, cet acide aminé n'est pas utilisé par *E. coli* et par conséquent les bactéries en expériences utilisaient le sulfate du milieu, puisqu'elles étaient radioactives.

Nous avons donc repris ces expériences avec de la L-cystine.

Nous réalisons 3 séries de milieux contenant respectivement :

26 μg de S sulfate + 52 μg de S cystine par ml.

26 μg de S sulfate + 26 μg de S cystine par ml.

26 μg de S sulfate + 13 μg de S cystine par ml.

Le taux croissant des milieux en L-cystine permettra de déterminer la dose optimale de cet acide aminé capable de subvenir à tous les besoins en soufre des bactéries. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 4.

Nous constatons que la radioactivité incorporée par les bactéries est pratiquement nulle en regard de la radioactivité présentée par les bactéries cultivées en milieu S^* ou $S^* + M$. La cystine est donc bien utilisée préférentiellement au sulfate pour la synthèse des composés soufrés, pour lesquels la cystine suffit comme unique source de soufre comme l'ont montré ROBERTS et coll. . Cependant, les bactéries cultivées dans un milieu ne renfermant que 13 μg de soufre cystinique présentent une radioactivité marquée après 11 heures de culture . Après six heures de culture cette radioactivité était négligeable . Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'après un certain temps de culture, situé entre la 6ème heure et la 11ème heure, les bactéries ont épuisé totalement ou en partie le soufre cystinique mis à leur disposition ; et par effet compétitif, ces bactéries ont alors utilisé une partie du soufre minéral du milieu et par conséquent élaboré des substances marquées au soufre . La discordance entre les deux valeurs de RAT_{135} et 717, est en faveur de cette hypothèse . Notons que, dans la culture en présence de sulfate seul, la valeur de RAT est supérieure à 2 000 .

Tableau n° 4

Incorporation de la L-cystine dans les bactéries .

Toutes les fioles renferment la même quantité de traceur S^* .

Les teneurs en sulfate (S^*) et cystine (C) sont calculées en μg de S par ml de milieu .

Milieu	Temps de culture	D.O.	RAT	Temps de culture	D.O.	RAT
26 $\mu\text{g } S^*$ + 52 $\mu\text{g } C$	6 h	29 30	12 10	11 h	35 37	12 14
26 $\mu\text{g } S^*$ + 26 $\mu\text{g } C$	6 h	26 27	37 10	11 h	31 32	10 13
26 $\mu\text{g } S^*$ + 13 $\mu\text{g } C$	6 h	32 32	16 19	11 h	37 34	717 135

CHAPITRE III

ETUDE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINÉS SOUFRES CHEZ E. COLI N AU COURS DE LA CROISSANCE

Au cours de nos expériences précédentes concernant l'influence de la nature de la source de soufre sur la synthèse des acides aminés soufrés, nous nous étions contenté de mesurer l'incorporation du soufre dans les bactéries sur deux prélèvements seulement. L'un effectué au cours de la phase de croissance logarithmique, l'autre en fin de croissance. Or, il n'était pas impossible que cette manière d'opérer nous masque certains phénomènes se produisant au cours du développement bactérien. Pour cette raison, nous avons entrepris de suivre l'incorporation de $^{35}\text{SO}_4^{--}$ en effectuant des prélèvements plus nombreux au fur et à mesure de la croissance.

Ces expériences ont été répétées plusieurs fois, mais dans des conditions légèrement différentes pour chacune d'elle : nous avons conservé la technique de compétition isotopique dont le principe a été décrit au chapitre I, mais nous avons utilisé différentes techniques d'inoculation des cultures.

I. TECHNIQUES UTILISEES

A. Inoculum faible de bactéries non marquées

Dans ces expériences les bactéries utilisées pour inoculer les ballons de milieux sont constituées par une culture de E. coli N en tube à essais en milieu N, non radioactif. Les milieux sontensemencés dans les conditions standard décrites au chapitre I (voir p.14, C - Méthode de culture). Les bactéries apportées par cet inoculum ne sont donc pas marquées. Deux ballons contenant l'un du milieu S^* , l'autre du milieu $\text{S}^* + \text{M}$, sontensemencés de façon standard et simultanément, puis mis en culture à 37° avec aération. La radioactivité du milieu, apportée par le sulfate, est voisine de 2 000 c/min/ml. La teneur en sulfate et en méthionine (pour le ballon qui en renferme) est de 26 $\mu\text{g/ml}$, exprimée en S, pour chaque constituant.

On suit l'augmentation de D.O. par des prélèvements effectués tout au long de la culture de façon à réaliser des prélèvements chaque fois que cette D.O. a augmenté de façon sensible.

Afin de permettre la comparaison, les cultures en milieu S^{*} et en milieu S^{*} + M sont menées en parallèle .

Les techniques de récolte et de fractionnement des bactéries, ainsi que celles de la mesure de la radioactivité fixée par les bactéries ont été décrites au chapitre I, p. 17 .

Nous avons bien entendu prélevé pour la détermination de RAT le même volume de culture que pour la détermination de RAP .

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 5 . Nous les discuterons au paragraphe 2 p. 47 en même temps que les résultats correspondant aux expériences décrites aux paragraphes B et C, p. 43 et 45 .

Tableau n° 5

E. coli N, inoculum faible, milieu N marqué dès le début (quand D.O. atteint 13, les bactéries sont entièrement marquées) .

Temps de culture en heures	D.O. de la culture	RAT	$\frac{RAT}{D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{D.O.}$
Milieu S [*]					
4	13	72	5,5	63	4,8
6	35	176	5,0	152	4,3
7	45	253	5,6	213	4,7
8	52	293	5,6	238	4,5
Moyenne			5,4		4,6
Milieu S [*] + M					
5,15	17	30	1,7	20	1,1
5,45	22	40	1,8	25	1,1
6,15	31	61	1,9	41	1,3
6,45	40	75	1,8	49	1,2
9	50	83	1,6	56	1,1
Moyenne			1,8		1,1

B . Inoculum important de bactéries non marquées et carencées en soufre

Dans cette série d'expériences, nous avons modifié la technique d'inoculation de la façon suivante : d'une part les milieux sontensemencés avec un inoculum

apportant une grande quantité de bactéries, d'autre part les bactéries inoculées sont carencées en soufre par culture préalable sur le milieu dépourvu de sulfate de sodium. Le fait d'avoir carencé en soufre les bactéries qui serviront d'inoculum a pour but de rendre ces bactéries, qui ont épuisé leurs réserves, (46) particulièrement avides de soufre.

Préparation de l'inoculum : Un ballon de 200 ml contenant 100 ml de milieu N est ensemencé de façon standard et cultivé avec aération durant 10 heures. Les bactéries sont récoltées par centrifugation stérile, puis lavées une fois avec une solution de ClNa à 9 g par litre afin d'éviter de leur faire subir un traitement par trop brutal comme ce serait le cas avec de l'eau distillée. Une nouvelle centrifugation permet de séparer un culot bactérien qui est alors transvasé de façon stérile dans 100 ml de milieu N stérile dépourvu de source de soufre. Les produits employés pour la préparation de ce milieu sont purs mais il n'est pas impossible qu'ils apportent une très minime quantité de soufre minéral ou que la verrerie apporte également des traces de soufre minéral. De toutes façons, la quantité de soufre "contaminant" est tout à fait insuffisante pour les besoins de *E. coli* et dans ces conditions la croissance bactérienne est très réduite. On ne note en effet qu'un faible développement des bactéries, au cours duquel celles-ci épuisent leur réserve interne de soufre, constituée par le glutathion et les protéines alcoolosolubles, pour synthétiser probablement d'autres protéines. Quand ces réservoirs de soufre sont épuisés, la croissance est stoppée. Dans nos conditions expérimentales, nous n'observons cependant pas cet épuisement des réserves et du glutathion puisque RAT reste supérieure à RAP.

Après 14 heures de culture à 37° dans ce milieu aéré, les bactéries sont récoltées et lavées deux fois avec une solution stérile de ClNa à 9 g par litre. Les bactéries carencées récoltées sont remises en suspension dans 50 ml d'eau distillée stérile. La quantité d'inoculum ajoutée dans chaque ballon est calculée de façon à donner une D.O. de départ voisine de 10.

Le protocole suivi est ensuite identique à celui des expériences avec inoculum faible. Cependant les volumes des prélèvements sont plus importants.

Dans ce cas, de chaque mesure de D.O. nous avons soustrait la D.O. de départ de la culture afin de ne tenir compte que des protéines synthétisées à l'exclusion de celles de l'inoculum. Notons que les bactéries apportées par l'inoculum ne sont pas radioactives. Par conséquent, dans chaque prélèvement nous aurons une certaine quantité de bactéries non marquées. La présence de ces bactéries non

radioactives qui interviennent dans la mesure de D.O. , dilue la radioactivité des protéines synthétisées à partir du moment de l'inoculation . Aussi les mesures de RA effectuées sur ces bactéries ne correspondraient-elles pas à la totalité du soufre bactérien . En soustrayant la D.O. du départ nous éliminons cette interférence . La nouvelle valeur de D.O. ainsi obtenue est appelée Δ D.O.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 6 .

Tableau n° 6

E. coli N, milieu N, inoculum fort de bactéries carencées en S, non marqué .

Temps de culture en heures	Δ D.O.	RAT	$\frac{RAT}{\Delta D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{\Delta D.O.}$
Milieu S *					
2,50	9	355	39,4	280	31,1
3,15	16	543	34,0	500	31,2
3,40	24	935	39,0	625	26,0
4,05	33	1 305	39,6	1 075	32,6
4,25	40	1 625	40,5	1 635	-
Moyenne			38,5		30,2
Milieu S * + M					
2,45	13	155	11,9	124	9,5
3,35	19	330	11,4	293	10,1
4,05	38	545	14,3	403	10,6
4,30	44	590	13,4	472	10,7
6,25	48	700	14,6	495	10,3
Moyenne			13,1		10,2

C . Inoculum important de bactéries marquées et carencées en soufre

Dans les expériences décrites au paragraphe précédent, nous utilisons un inoculum fort de bactéries non marquées, qui nous avait conduit à retrancher de la D.O. du prélèvement, la D.O. de départ de la culture, ce que nous avons symbolisé par Δ D.O. . Cependant, cette technique a l'inconvénient d'introduire au départ dans

le milieu d'expérience une forte quantité de protéines bactériennes non radioactives. Nous avons voulu éliminer cette interférence et pour cela nous avons entrepris des expériences utilisant un fort inoculum de bactéries marquées au soufre par culture dans un milieu renfermant du $^{35}\text{SO}_4^{--}$.

La préparation de l'inoculum est identique à celle décrite au paragraphe précédent à la différence près qu'il est obtenu sur un milieu marqué à 2 000 coups par minute alors que dans le cas précédent il était obtenu sur un milieu non marqué.

Afin de ne tenir compte que des protéines synthétisées depuis l'inoculation, nous avons soustrait des valeurs mesurées de RAT et de RAP, la radioactivité de RAT et de RAP apportée par l'inoculum. Les nouvelles valeurs ainsi obtenues sont appelées Δ RAT et Δ RAP.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 7.

Tableau n° 7

E. coli N, milieu N, inoculum fort de bactéries carencées en S, et marquées.

Temps de culture en heures	Δ D.O.	Δ RAT	$\frac{\Delta \text{RAT}}{\Delta \text{D.O.}}$	Δ RAP	$\frac{\Delta \text{RAP}}{\Delta \text{D.O.}}$
Milieu S *					
2,20	7	237	33,9	200	28,5
2,40	10	337	33,7	343	34,3
3	16	497	31	450	28,2
3,20	21	602	28,6	-	-
3,40	27	907	33,6	805	29,8
4	32	1 092	34,1	-	-
4,20	36	1 287	35,8	-	-
Moyenne			32,9	30,2	
Milieu S * + M					
2,15	13	101	7,8	97	7,4
2,35	18	155	8,6	134	7,4
2,55	24	196	8,1	-	-
3,15	30	295	9,8	286	9,5
3,35	34	360	10,6	306	9
3,55	37	480	13	353	9,5
4,15	39	485	12,4	351	9
5,35	39	488	12,5	366	9,4
Moyenne			10,3	8,7	

II . DISCUSSION DES RESULTATS

En comparant les résultats des trois séries d'expériences que nous venons de décrire, nous constatons que :

1) d'une série d'expériences à l'autre, les valeurs de RAT/D.O. d'une part, celles de RAP/D.O. d'autre part, diffèrent dans d'assez larges limites . Ce fait est dû à ce que les prélèvements sur lesquels ont été réalisées les mesures ne sont pas tous d'un volume équivalent dans une expérience et dans l'autre . En effet, quand les récoltes ont été réalisées avec filtration sur membrane, nous avons pu effectuer des prélèvements de culture plus importants dans un temps suffisamment court . Les valeurs brutes obtenues dans les différentes séries d'expériences ne sont donc pas directement comparables . Cependant la radioactivité de chaque milieu est sensiblement la même dans toutes les expériences et les volumes des prélèvements effectués en milieu S^* et en milieu $S^* + M$ sont identiques dans une même série d'expériences où les résultats sont donc directement comparables .

2) L'augmentation des valeurs de RAT et de RAP suit l'augmentation de D.O. Le sulfate est donc bien incorporé de façon constante par les bactéries durant toute la culture, aussi bien en présence qu'en l'absence de méthionine . La présence de méthionine ne semble donc pas perturber la synthèse protéique .

3) En présence de méthionine, les bactéries fixent trois fois moins de soufre qu'en son absence ; la radioactivité fixée dans les protéines correspond alors uniquement à la cystéine .

Nous pouvons distinguer la part de radioactivité due à la méthionine de celle due à la cystéine . En effet, la différence de radioactivité présentée par les bactéries qui ont poussé en milieu S^* et celles qui ont poussé en milieu $S^* + M$ correspond à la radioactivité de la cystéine . Mais la cystéine des bactéries se trouve d'une part dans les protéines bactériennes, d'autre part dans le glutathion . Or par traitement à l'acide trichloracétique nous éliminons ce tripeptide et isolons les protéines bactériennes . La différence entre la radioactivité des bactéries totales et la radioactivité des protéines bactériennes correspond donc à la cystéine du glutathion .

Nous pouvons ainsi calculer que les trois quarts environ de la radioactivité se retrouvent dans les protéines, la cystéine intervenant pour un tiers de cette radioactivité et la méthionine pour les deux autres tiers . Le quart restant correspond à la cystéine du glutathion . Ces résultats sont bien en accord avec ceux de ROBERTS et coll. (46) .

4) Dans une même expérience RAT/D.O. et RAP/D.O. restent sensiblement constants la synthèse protéique est donc constante durant toute la culture. Par conséquent à une quantité définie de protéines correspondra toujours une quantité déterminée de soufre si le milieu de culture contient suffisamment de sulfate pour assurer une croissance normale des bactéries.

5) D'une expérience à l'autre la valeur du rapport RAP/RAT reste constante. Par conséquent le comportement de *E. coli* N dans les trois séries d'expériences que nous venons de décrire est le même du point de vue du métabolisme soufré considéré dans son ensemble. Cependant, cette apparente constance masquait peut-être des différences apparues dans la répartition des constituants soufrés au sein des protéines bactériennes et en particulier en ce qui concerne la méthionine. Aussi, afin de déterminer s'il existe une stabilité du point de vue de la biosynthèse de la méthionine, avons-nous déterminé le taux de cet acide aminé et le rapport de la méthionine synthétisée au soufre total et au soufre protéique fixé par les bactéries.

Les calculs ont été effectués ainsi :

- 1) En milieu S^{*} , la radioactivité totale des bactéries correspond au soufre incorporé dans glutathion + cystéine + méthionine, soit $RAT = G + C + M$.
La radioactivité des protéines correspond au soufre incorporé dans cystéine + méthionine, soit $RAP = C + M$.
- 2) En milieu $S^{*} + M$, RAT correspond à glutathion + cystéine = $G + C$.
RAP correspond à la cystéine = C .

Nous avons donc deux possibilités pour calculer la méthionine (M). D'une part en soustrayant $G + C$ de RAT obtenu en milieu S^{*} . D'autre part en soustrayant RAP obtenu en milieu S^{*} .

Nous obtenons deux valeurs a et b qui devraient être identiques et qui le sont effectivement, aux erreurs expérimentales près. Nous avons pris la moyenne de ces deux valeurs.

Pour déterminer le rapport du soufre méthionine (S Méth.) au soufre total fixé par les bactéries, il suffit de diviser la valeur moyenne de la méthionine par la valeur de RAT obtenue en milieu S^{*} .

Pour déterminer le rapport du S méth. au soufre protéique, il suffit de diviser la valeur moyenne de la méthionine par la valeur de RAP en milieu S^{*} .

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° 8. Ce tableau résume les caractéristiques de la souche *E. coli* N en fonction du mode d'inoculation. Les valeurs moyennes de RAT/D.O. et de RAP/D.O. figurant dans les tableaux n° 5, n° 6 et n° 7 nous ont permis de déterminer les valeurs de RAP/RAT qui figurent dans ce tableau.

Le taux de méthionine synthétisée est pratiquement constant dans toutes les expériences ainsi que le montrent les rapports $\frac{S \text{ méth}}{RAT}$ et $\frac{S \text{ méth}}{RAP}$.

Tableau n° 8

Synthèse de la méthionine chez E. coli N en milieu N.

	Inoculum faible non marqué	Inoculum fort non marqué	Inoculum fort marqué
Milieu S [*] $\frac{RAP}{RAT}$	0,87	0,78	0,91
Milieu S [*] + M $\frac{RAP}{RAT}$	0,66	0,77	0,84
Méthionine a (1)	3,64	25,40	22,54
Méthionine b	3,43	19,95	21,43
Moyenne	3,53	22,62	21,99
$\frac{S \text{ méth}}{RAT}$	0,65	0,59	0,67
$\frac{S \text{ méth}}{RAP}$	0,77	0,75	0,73

- (1) Méthionine a = RAT en milieu S^{*} (G + C + M) - RAT en milieu S^{*} + M (G + C)
Méthionine b = RAP en milieu S^{*} (C + M) - RAP en milieu S^{*} + M (C)

Nous étant ainsi assuré de la constance de la synthèse de la méthionine chez E. coli N nous avons pu aborder l'étude de cette synthèse chez les souches sulfamido-résistantes, E. coli SA 5 et E. coli SA 10.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINES SOUFRES CHEZ E. COLI SULFAMIDORESISTANT AU COURS DE LA CROISSANCE COMPARAISON AVEC E. COLI SULFAMIDOSENSIBLE

Nous étudions dans ce chapitre le métabolisme soufré de nos souches de *E. coli* adaptées à pousser en présence de sulfanilamide . Ces études ont été faites dans les mêmes conditions que celles décrites pour *E. coli* N au chapitre III . Les expériences ont été pratiquées non seulement en milieu SA 5 ou SA 10 suivant la souche en expérience, mais également en milieu N pour chacune des souches . Nous voulions ainsi voir, si l'absence de sulfanilamide dans le milieu de culture s'accompagnait d'une modification métabolique chez les souches adaptées à la sulfanilamide . Les expériences avec un fort inoculum n'ont été faites qu'avec *E. coli* SA 5 en milieu SA 5 .

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux n° 9 à 14 . Il ressort de ces résultats que les conclusions que nous avons formulées pour la souche *E. coli* N au chapitre précédent sont également valables pour les souches *E. coli* SA 5 et *E. coli* SA 10, que ces bactéries soient cultivées en présence ou en l'absence de sulfanilamide . Notons cependant qu'en milieu sulfamidé et en présence de méthionine , la croissance débute plus rapidement qu'en l'absence de cet acide aminé . La présence de méthionine dans le milieu de culture favoriserait donc la croissance de *E. coli* ; les bactéries semblent-elles préféreraiient puiser cet acide aminé dans le stock mis à leur disposition, plutôt que d'en faire la synthèse, que la présence d'un antifolique rend peut être plus difficile ?

Tableau n° 9

E. coli SA 5 en milieu N . Faible inoculum

Temps de culture en heures	D.O.	RAT	$\frac{RAT}{D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{D.O.}$
Milieu S *					
4,30	10	50	5,0	45	4,50
7	24	118	4,9	99	4,1
8	37	195	5,2	164	4,4
9	53	265	5,0	212	4,0
Moyenne			5,0		4,2
Milieu S * + M					
13,30 (1)	22	35	1,5	20	0,91
14	30	46	1,5	27	0,90
14,40	37	52	1,4	32	0,86
16	47	62	1,3	41	0,87
Moyenne			1,4		0,89

(1) Ce retard au départ de la croissance est inexpliqué .

Tableau n° 10

E. coli SA 5 en milieu SA 5 . Faible inoculum .

Temps de culture en heures	D.O.	RAT	$\frac{RAT}{D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{D.O.}$
Milieu S *					
7,35	15	76	5,0	52	3,4
8,30	19	104	5,4	80	4,2
11,20	40	206	5,1	142	3,5
13	44	240	5,4	183	4,1
Moyenne			5,2		3,8
Milieu S * + M					
6,20	16	30	1,8	17	1,0
7	20	38	1,9	20	1,0
9,30	40	73	1,8	42	1,0
11,20	46	72	1,5	40	0,87
Moyenne			1,7		1

Tableau n° 11

E. coli SA 5 en milieu SA 5 . Inoculum fort, carencé, non marqué

Temps de culture en heures	$\Delta D.O.$	RAT	$\frac{RAT}{\Delta D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{\Delta D.O.}$
Milieu S *					
2	7	271	38,7	233	33,3
2,40	13	475	46,5	425	32,8
3,20	22	785	35,6	715	32,5
4,15	35	1 345	38,4	1 020	29,2
4,45	42	1 540	39	1 470	35
Moyenne			37,6		31,9
Milieu S * + M					
2,20	11	104	9,4	91	8,3
2,40	15	159	10,6	141	9,4
3	19	189	9,9	145	7,6
3,20	24	247	10,3	190	7,9
3,50	32	339	10,6	317	9,9
4,20	38	445	11,7	345	9,1
Moyenne			10,4		8,7

Tableau n° 12

E. coli SA 5 en milieu SA 5 . Inoculum fort, carencé, marqué

Temps de culture en heures	$\Delta D.O.$	ΔRAT	$\frac{\Delta RAT}{\Delta D.O.}$	ΔRAP	$\frac{\Delta RAP}{\Delta D.O.}$
Milieu S *					
2,40	9	324	36	250	27,8
3,40	19	778	40,9	520	27,4
4,40	30	1 030	34,3	858	28,6
5	34	1 370	40,3	915	26,9
5,45	41	1 570	38,3	1 430	34,9
6,15	44	1 670	38	1 575	35,9
6,45	46	1 770	38,5	1 620	35,2
Moyenne			38		30,9
Milieu S * + M					
2,20	7	88	12,5	67	9,5
3,20	16	153	9,5	154	9,6
3,40	20	204	10,2	151	7,5
4,20	27	279	10,3	180	6,6
4,40	32	374	11,7	332	10,4
5,50	37	514	13,9	324	8,7
6,20	37	549	14,8	326	8,3
Moyenne			11,9		8,7

Tableau n° 13

E. coli SA 10 en milieu N. Faible inoculum .

Temps de culture en heures	D.O.	RAT	$\frac{RAT}{D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{D.O.}$
Milieu S *					
0	15	85	5,6	71	4,7
7,30	30	167	5,3	138	4,6
8,15	40	191	4,7	143	3,5
10	16	239	5,2	182	3,9
Moyenne			5,2		4,2
Milieu S * + M					
9	18	38	2,1	21	1,1
10	34	55	1,6	38	1,1
10,30	41	74	1,8	43	1,0
11,30	46	71	1,5	48	1,0
14	44	72	1,6	48	1,0
Moyenne			1,7		1,0

Tableau n° 14

E. coli SA 10 en milieu SA 10 . Faible inoculum .

Temps de culture en heures	D.O.	RAT	$\frac{RAT}{D.O.}$	RAP	$\frac{RAP}{D.O.}$
Milieu S *					
10,15	15	77	5,1	62	4,1
11,30	23	140	6,0	95	4,1
13	30	183	6,1	134	4,4
14,30	32	196	6,1	150	4,6
19	34	197	5,8	165	4,8
Moyenne			5,8		4,4
Milieu S * + M					
10,15	19	36	1,9	19	1,0
11,30	27	66	2,4	33	1,2
13	35	66	1,8	41	1,1
14,30	34	85	2,5	43	1,2
Moyenne			2,1		1,1

Les tableaux n° 15 et 16 résument les caractéristiques des souches SA 5 et SA 10 en fonction de leur milieu de culture et du mode d'inoculation . Le rapport RAP/RAT reste le même que dans le cas de E. coli N . Le taux de méthionine synthétisée est constant et identique à celui qui a été calculé pour E. coli N . Ces résultats nous permettent de conclure à l'absence de différence entre nos trois souches E. coli N, E. coli SA 5 et E. coli SA 10 du point de vue de la teneur de la méthionine .

Tableau n° 15

Souches E. coli SA 5 et E. coli SA 10 . Inoculum faible .

	E. coli SA 5		E. coli SA 10	
Milieu S [*] $\frac{RAP}{RAT}$	0,84	0,73	0,80	0,76
Milieu S [*] +M $\frac{RAP}{RAT}$	0,61	0,56	0,63	0,53
Méthionine a (1)	3,58	3,49	3,51	3,67
Méthionine b	3,37	2,84	3,12	3,30
Moyenne	3,47	3,17	3,32	3,48
$\frac{S \text{ Méth}}{RAT}$	0,69	0,60	0,64	0,59
$\frac{S \text{ Méth}}{RAP}$	0,81	0,82	0,79	0,78

(1) Voir tableau n° 8 p. 49 .

Tableau n° 16

E. coli SA 5 en milieu SA 5 . Inoculum fort .

	Inoculum non marqué	Inoculum marqué
Milieu S * $\frac{RAP}{RAT}$	0,84	0,81
Milieu S * + M $\frac{RAP}{RAT}$	0,83	0,73
Méthionine a (1)	27,18	26,10
Méthionine b	23,8	22,20
Moyenne	25,49	24,15
$\frac{S \text{ Méth}}{RAT}$	0,68	0,63
$\frac{S \text{ Méth}}{RAP}$	0,80	0,78

(1) Voir (1) tableau n° 8 p. 49 .

CHAPITRE V

CINETIQUE DE L'INCORPORATION DU SOUFRE CHEZ E. COLI N

Si à des bactéries en phase exponentielle de croissance en milieu contenant du $^{32}\text{SO}_4^{--}$ comme source de soufre, on ajoute du $^{35}\text{SO}_4^{--}$ la radioactivité incorporée ne mesurera que les protéines synthétisées après l'addition du traceur. Le taux de soufre incorporé dans les protéines sera proportionnel à la masse des bactéries

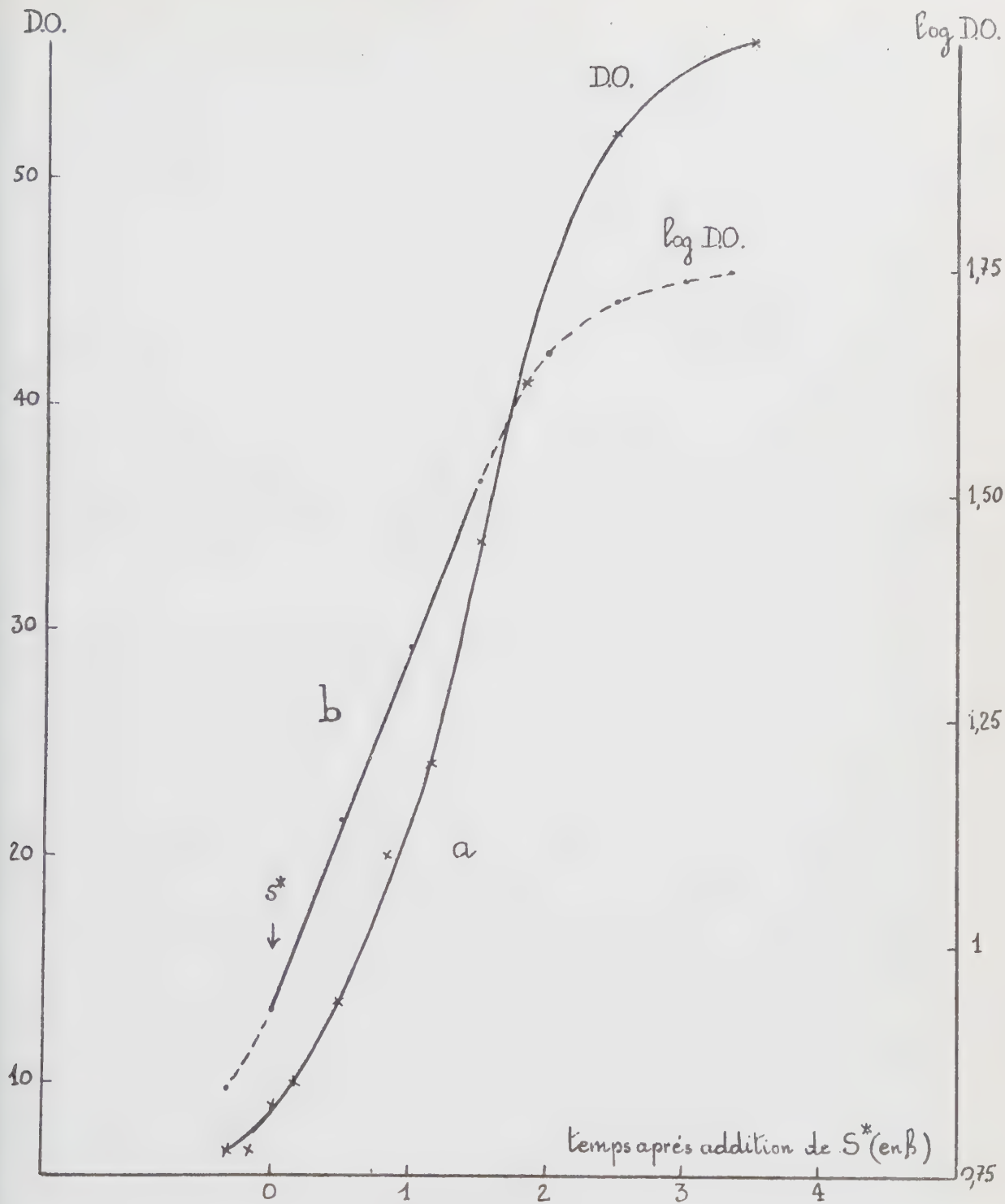
Ainsi afin de déceler une éventuelle différence de comportement de ce point de vue entre nos trois souches, avons-nous entrepris l'étude de la cinétique de l'incorporation du soufre dans les protéines de ces bactéries. Nous étudierons dans ce chapitre le cas de E. coli N, réservant le chapitre suivant à l'étude de E. coli SA 5 et SA 10.

I. TECHNIQUE DE CULTURE

Nous réalisons une culture en ballon sur milieu S^* et une culture en milieu $\text{S}^* + \text{M}$. Les cultures sont réalisées en parallèle avec aération à 37° ; les ballons de milieu sont inoculés de façon standard. On suit l'augmentation de D.O. de la culture. Quand celle-ci atteint environ 10, c'est-à-dire quand nous sommes au début de la phase logarithmique de croissance, on ajoute dans chaque ballon le traceur $^{35}\text{SO}_4^{--}$ de façon à obtenir une radioactivité d'environ 3 000 c/min/ml de milieu. A partir de ce moment, on réalise chaque demi-heure environ des prélèvements de chacun des milieux afin de mesurer D.O. et de déterminer RAP.

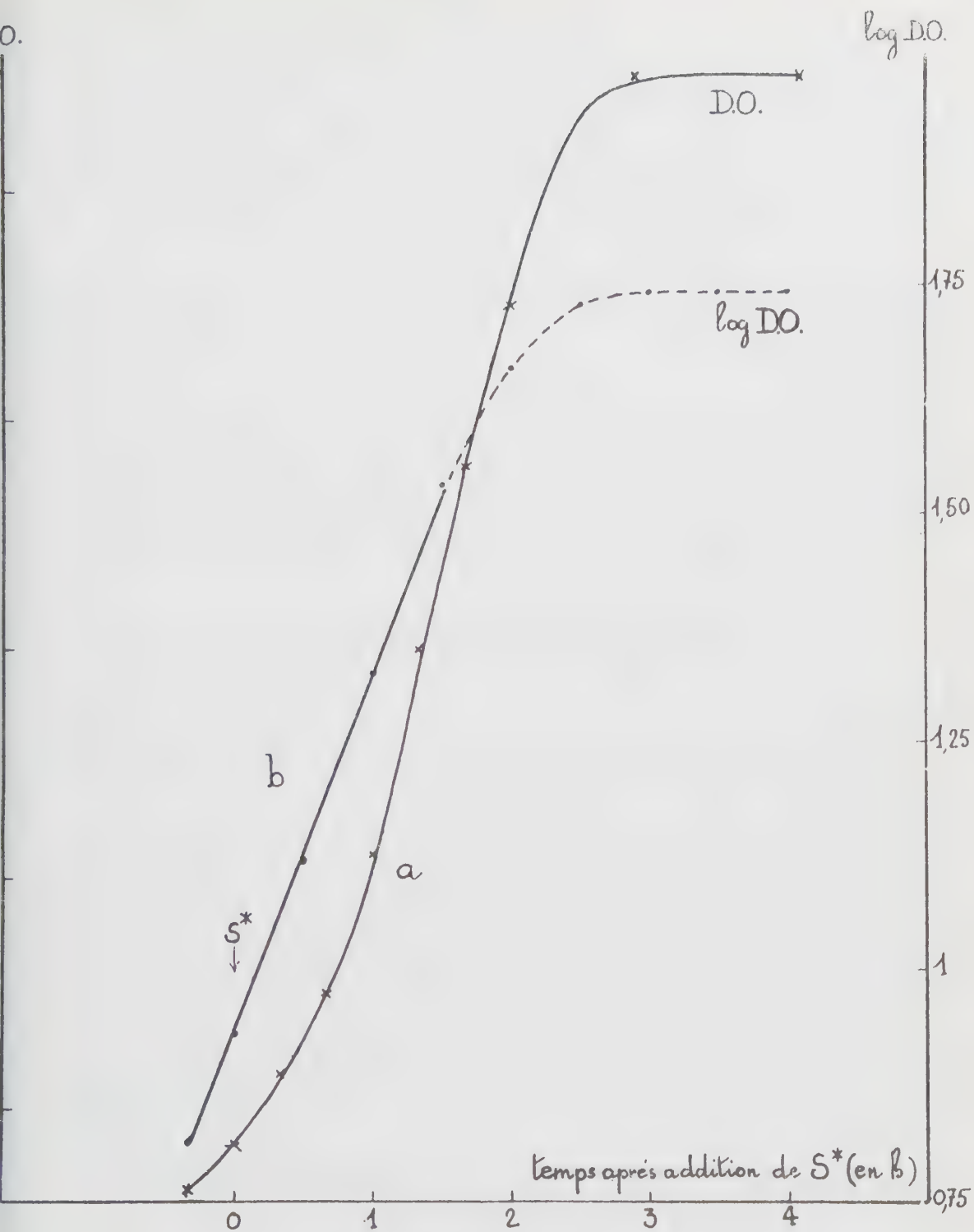
II. ETUDE DE LA CROISSANCE

Sur les graphiques n° 5 et 6, nous avons représenté la croissance observée au cours de l'expérience. En plaçant les temps en abscisse et la D.O. en ordonnée, nous obtenons une courbe classique en S (courbe a). Par conséquent la croissance de nos bactéries s'effectue normalement. Si maintenant nous représentons la croissance des bactéries en gardant les temps en ordonnée mais en plaçant en abscisse le logarithme de D.O., la courbe obtenue est une droite sur une partie de sa longueur (courbe b). La portion rectiligne correspond donc à une période de croissance exponentielle, période ne durant qu'un temps limité qui représente un faible nombre de multiplications des bactéries.



Graphique n° 5

Croissance de *E. coli* N en milieu S^* . a = représentation habituelle, b = représentation logarithmique.



Graphique n° 6

Croissance de *E. coli* N en milieu $S^* + M$. a = représentation habituelle
 = représentation logarithmique.

En milieu S^* (graphique n° 5) la croissance exponentielle se poursuit durant 1 h 30 après addition du traceur . Le log D.O. passe de 0,93 à 1,52 . La différence $1,52 - 0,93 = 0,59$ est très voisine de log de 4 . Ce qui indique qu'il y a en moyenne 2 multiplications successives en 1 h 30 .

En milieu $S^* + M$ (graphique n° 6) la croissance exponentielle se poursuit durant 1 h 30 après addition du traceur , le log D.O. passe de 0,93 à 1,53 . Il y a donc également en moyenne deux multiplications .

Pendant la période de croissance exponentielle l'équation des variations de D.O. est du type $D.O._t = D.O._0 e^{at}$, où $D.O._t$ représente la D.O. à un temps donné t après addition du traceur et $D.O._0$ la D.O. au moment de l'addition du traceur . De l'équation que nous venons de poser, nous tirons $e^{at} = \frac{D.O._t}{D.O._0}$.

III . ETUDE DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Comme nous l'avons montré au chapitre premier, la D.O. correspond à la masse bactérienne si la valeur est inférieure à 60 . Dans ces limites, l'équation de la croissance pondérale des bactéries sera donc la même que celle de D.O.

Cherchons à établir par le calcul les valeurs de la radioactivité que l'on doit retrouver dans les protéines bactériennes si l'incorporation de ^{35}S est exponentielle . Pour y parvenir nous pouvons appliquer les équations de ROBERTS et coll. (46) . Ces équations permettent d'étudier l'incorporation d'une substance marquée dans les protéines des bactéries en fonction du temps quand la croissance est exponentielle .

Soit X^* la quantité de protéines marquées au soufre au temps t , et X_0 la quantité de protéines non marquées existant au temps t_0 , c'est-à-dire au moment de l'addition du traceur .

$$\begin{aligned} \text{ROBERTS a calculé que } X^* &= X_0 e^{at} (1 - e^{-at}) \\ \text{soit } X^* &= X_0 (e^{at} - 1) \end{aligned} \quad \text{équation (1)}$$

Tant que la croissance est exponentielle nous pourrions calculer à l'aide de l'équation (1) la quantité théorique de soufre protéique non marqué X_0 existant au moment de l'addition de $^{35}SO_4^{--}$ (temps 0) . Pour cela nous déterminons X^* par l'expérience : X^* correspond à RAP mesurée .

Connaissant la valeur du soufre non marqué X_0 présent dans les protéines, au moment de l'addition du traceur, nous pourrions calculer la valeur théorique de X^* à l'aide de l'équation (1). Si de cette valeur nous soustrayons le soufre initial (X_0), nous devrions retrouver une valeur identique à celle que nous pouvons déterminer expérimentalement par mesure de l'incorporation de la radioactivité dans les protéines. Si c'est bien le cas nous pourrions affirmer que l'incorporation du soufre dans les protéines bactériennes suit bien une loi exponentielle.

Nous allons donc déterminer X^* par l'expérience et par le calcul, puis nous comparerons les deux valeurs ainsi obtenues correspondant au ^{35}S incorporé.

Rappelons que la culture en milieu S^* nous permet d'étudier l'incorporation du soufre dans les protéines puisque dans ce cas méthionine et cystéine sont marquées. La culture en milieu $\text{S}^* + \text{M}$ nous permet d'étudier l'incorporation du soufre dans la cystéine puisque dans ce cas seul ce dernier acide aminé est marqué.

A. Incorporation du soufre dans les protéines

Les résultats expérimentaux obtenus sont consignés dans le graphique n° 7 qui représente l'augmentation de la valeur de RAP en milieu S^* en fonction du temps. La courbe obtenue a la même allure générale que celle qui représente la D.O. en fonction du temps. L'augmentation de la radioactivité semble donc bien parallèle à l'augmentation de D.O.

A partir de ce graphique nous avons déterminé les valeurs de RAP au temps 0,5 h, 1 h et 1,5 h, cette dernière valeur correspondant à la durée de la croissance exponentielle après l'addition de $^{35}\text{SO}_4^{--}$. Ce qui donne :

t en heures	0	0,5	1	1,5
RAP	0	310	740	1 440

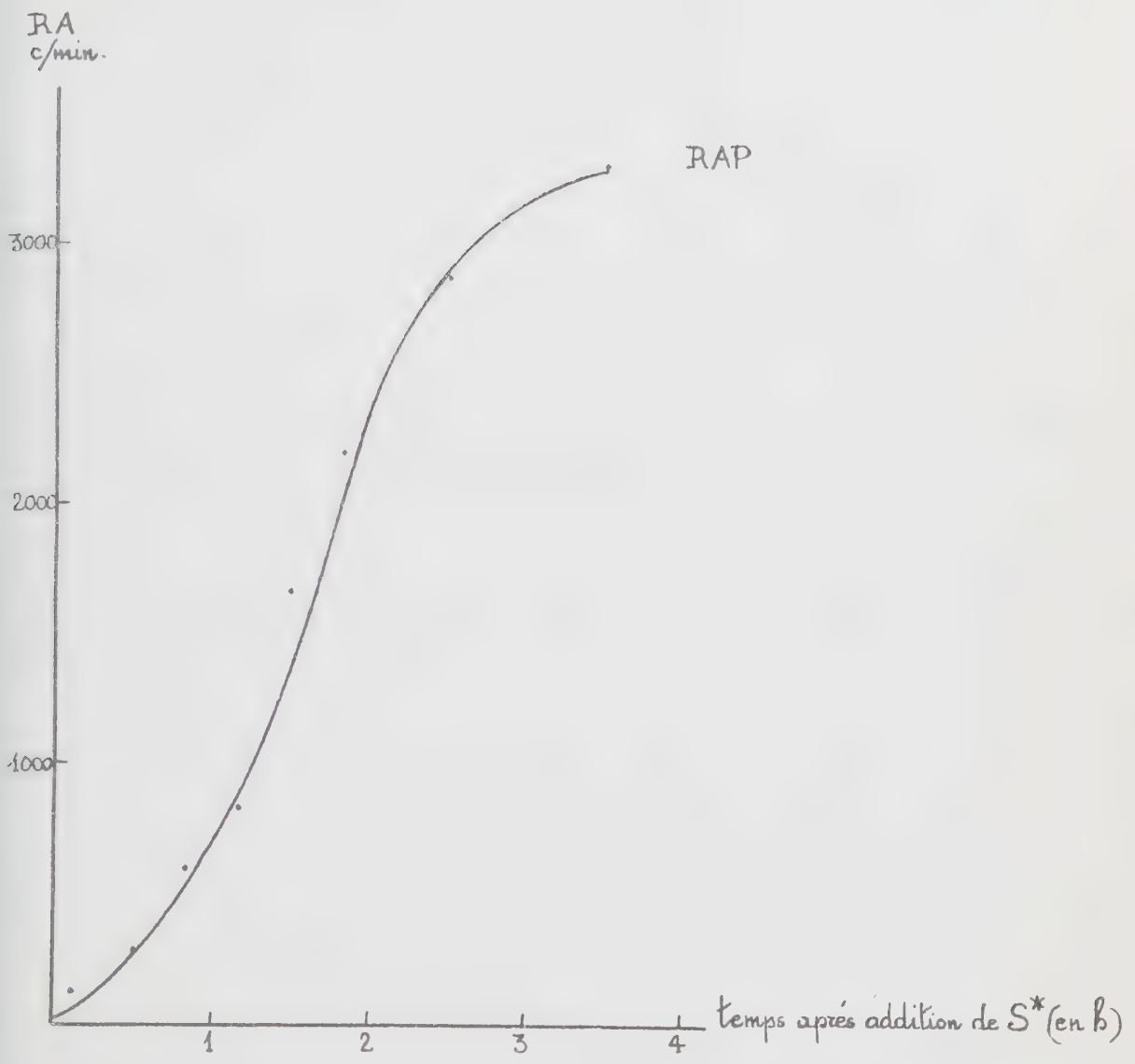
Nous pouvons calculer a pour t = 1 h

En effet du graphique n° 5 nous tirons $\text{D.O.}_t = 21,5$ et $\text{D.O.}_0 = 8,5$.

$$e^a = \frac{21,5}{8,5} = 2,53 \text{ d'où } a = 0,93, \text{ et en vertu de l'équation (1)}$$

$$X^* = X_0 (e^{0,93t} - 1).$$

Calculons maintenant les valeurs de X_0 aux différents temps.



Graphique n° 7

Incorporation de la radioactivité dans les protéines de *E. coli* N en milieu S^*

t en heures	X * théorique	X * obtenu expérimentalement	X _o déduit
0,5	0,605 X _o	310	513
1	1,53 X _o	740	484
1,5	3,03 X _o	1 440	475
moyenne			490

Nous pouvons dire qu'aux erreurs expérimentales près, les trois valeurs calculées pour X_o sont identiques. La valeur moyenne de 490 correspond ainsi au soufre protéique non marqué existant au temps zéro quand on ajoute ³⁵SO₄⁻⁻ (S initial)

Pour obtenir la valeur du soufre protéique incorporé depuis l'addition du traceur il suffira donc de soustraire S initial de la valeur calculée du soufre protéique (S p).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

temps en heures	Sp	S initial	S * calculé (Sp - S initial)	S * trouvé expérimentalement (= RAP)
0	490	490	0	
0,5	787	490	297	310
1	1 240	490	750	740
1,5	1 980	490	1 490	1 440

Les chiffres obtenus par le calcul et ceux fournis par l'expérience sont très voisins. L'incorporation du soufre dans les protéines suit donc bien la loi exponentielle de la croissance.

B . Incorporation du soufre dans la cystéine

Les résultats expérimentaux obtenus sont consignés dans le graphique n° 8 . Nous pouvons faire les mêmes constatations que pour la culture en milieu S^* , mais ici la radioactivité fixée est moins importante du fait de la présence de méthionine dans le milieu .

Appliquons ici le même raisonnement qu'au paragraphe A, p. . Les valeurs RAP tirées du graphique n° 8 sont :

Temps en heures	0	0,5	1	1,5
RAP	0	100	275	525

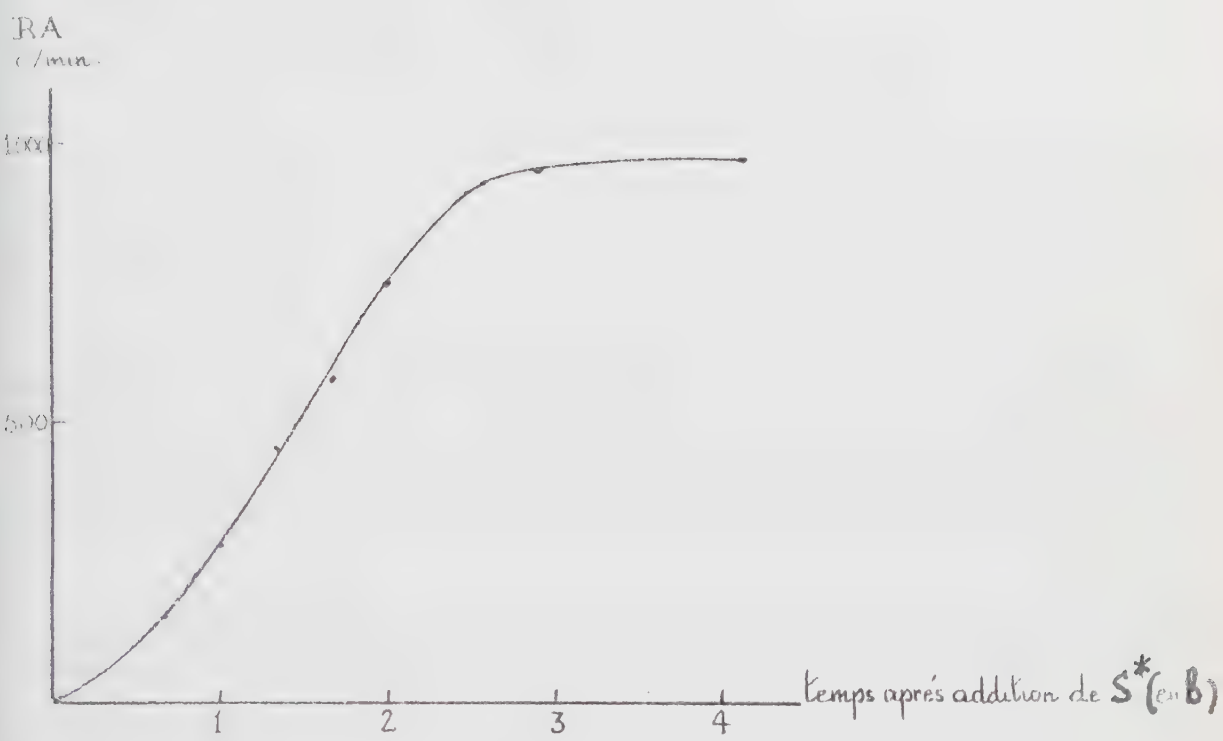
Calculons a pour $t = 1$ h, en lisant les D.O. aux temps zéro et 1 sur le graphique n° 6 :

$$e^a = \frac{21}{8,5} = 2,46 \text{ d'où } a = 0,90$$

Notons que cette valeur est très voisine de celle calculée en milieu S^* (0,93) et que par conséquent le taux de croissance est le même en milieu S^* et en milieu $S^* + M$.

Calculons les valeurs de X_0 aux différents temps à l'aide de l'équation (1) .

en t heure	X^* théorique	X^* obtenu expérimentale- ment	X_0 déduit
0,5	$0,57 X_0$	100	175
1	$1,46 X_0$	275	188
1,5	$2,85 X_0$	525	190
moyenne			184



Graphique n° 8

Incorporation de la radioactivité dans les protéines de E.coli N en milieu $S^* + M$

Pour obtenir la valeur du soufre cystéinique incorporé depuis l'addition du traceur, nous soustrayons le soufre non marqué existant au temps séro (S_{initial}) de la valeur calculée du soufre cystéinique (S_c).

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

Temps en heures	S_c	S_{initial}	S^* calculé ($S_c - S_{\text{initial}}$)	S^* trouvé expérimenta- lement = RAP
0	184	184	0	
0,5	288	184	104	100
1	452	184	268	275
1,5	709	184	525	525

Les résultats calculés et ceux obtenus expérimentalement concordent bien .
Par conséquent comme dans le cas du soufre protéique l'incorporation du soufre sous forme de cystéine suit bien une loi exponentielle de même type que celle de la croissance bactérienne chez *E. coli* N .

CHAPITRE VI

CINETIQUE DE L'INCORPORATION DU SOUFRE CHEZ E. COLI SULFAMIDO- RESISTANT . COMPARAISON AVEC E. COLI SULFAMIDO-SENSIBLE

Le protocole expérimental suivi pour les études de cinétique de l'incorporation du soufre chez E. coli SA 5 et E. coli SA 10 est le même que celui que nous avons décrit pour E. coli N . Dans ces expériences les deux souches résistantes à la sulfanilamide ont été cultivées sur milieu sulfamidé .

I . E. COLI SA 5

Les graphiques n° 9 et 10 représentent la croissance de E. coli SA 5 en milieu S^* et en milieu $S^* + M$, contenant 5 g de sulfanilamide par litre .

En milieu S^* (graphique n° 9) la croissance est exponentielle durant 2 h 30 après addition du traceur . Le log D.O. passe de 0,88 à 1,48 , ce qui correspond à deux multiplications bactériennes (voir page 56) .

En milieu $S^* + M$ (graphique n° 10) la croissance est exponentielle durant 1 h 30 après addition du traceur . Le log D.O. passe de 1,04 à 1,34 pour 1 multiplication (Voir page 56) .

Incorporation du soufre dans les bactéries

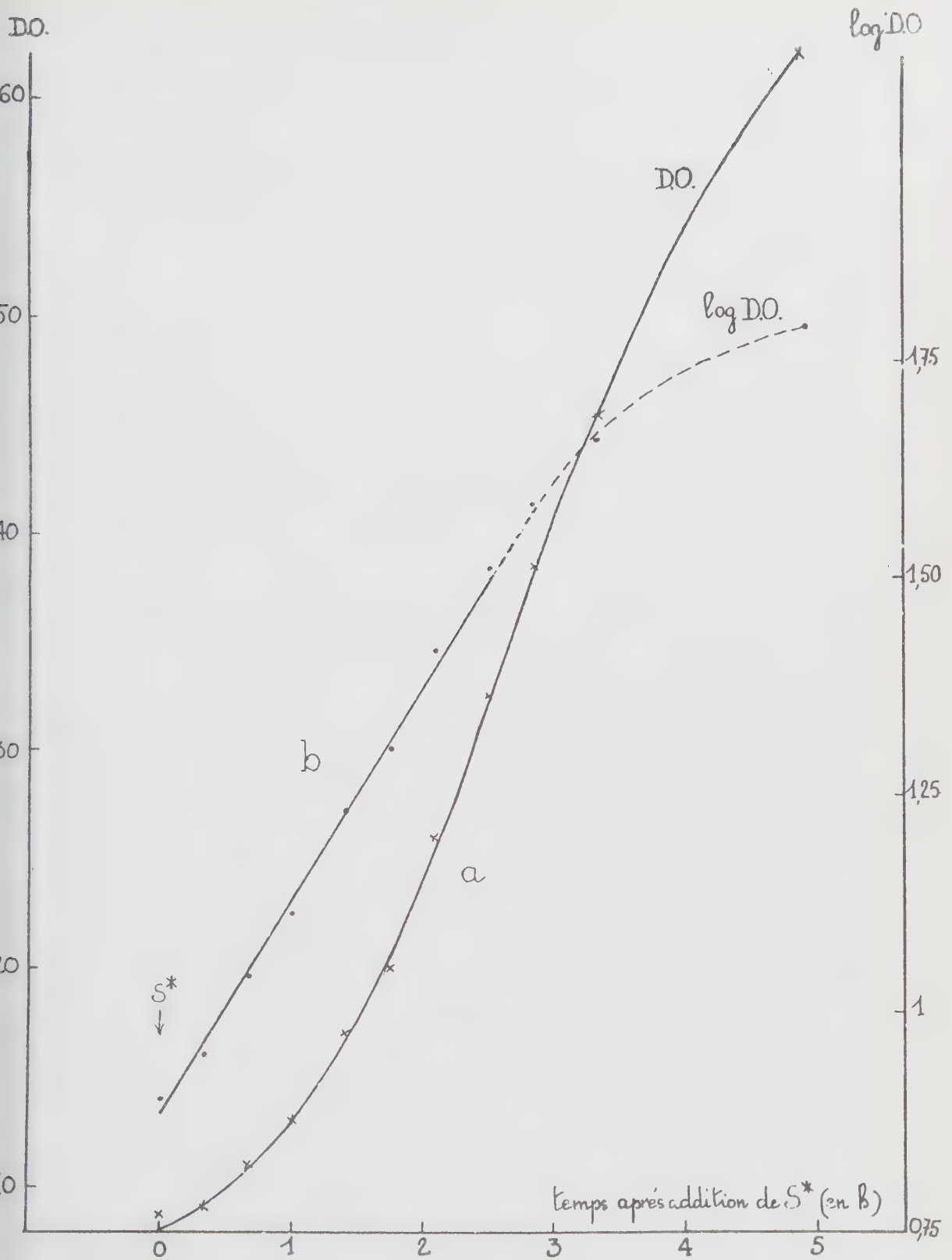
Les graphiques n° 11 et 12 représentent l'augmentation de la valeur de RAP en fonction du temps en milieu S^* et $S^* + M$.

Nous en tirons les valeurs de RAP à des temps régulièrement espacés .

a) Milieu S^* = incorporation de ^{35}S dans les protéines

Temps en heures	0,5	1	1,5	2	2,5
RAP	140	300	520	840	1 350

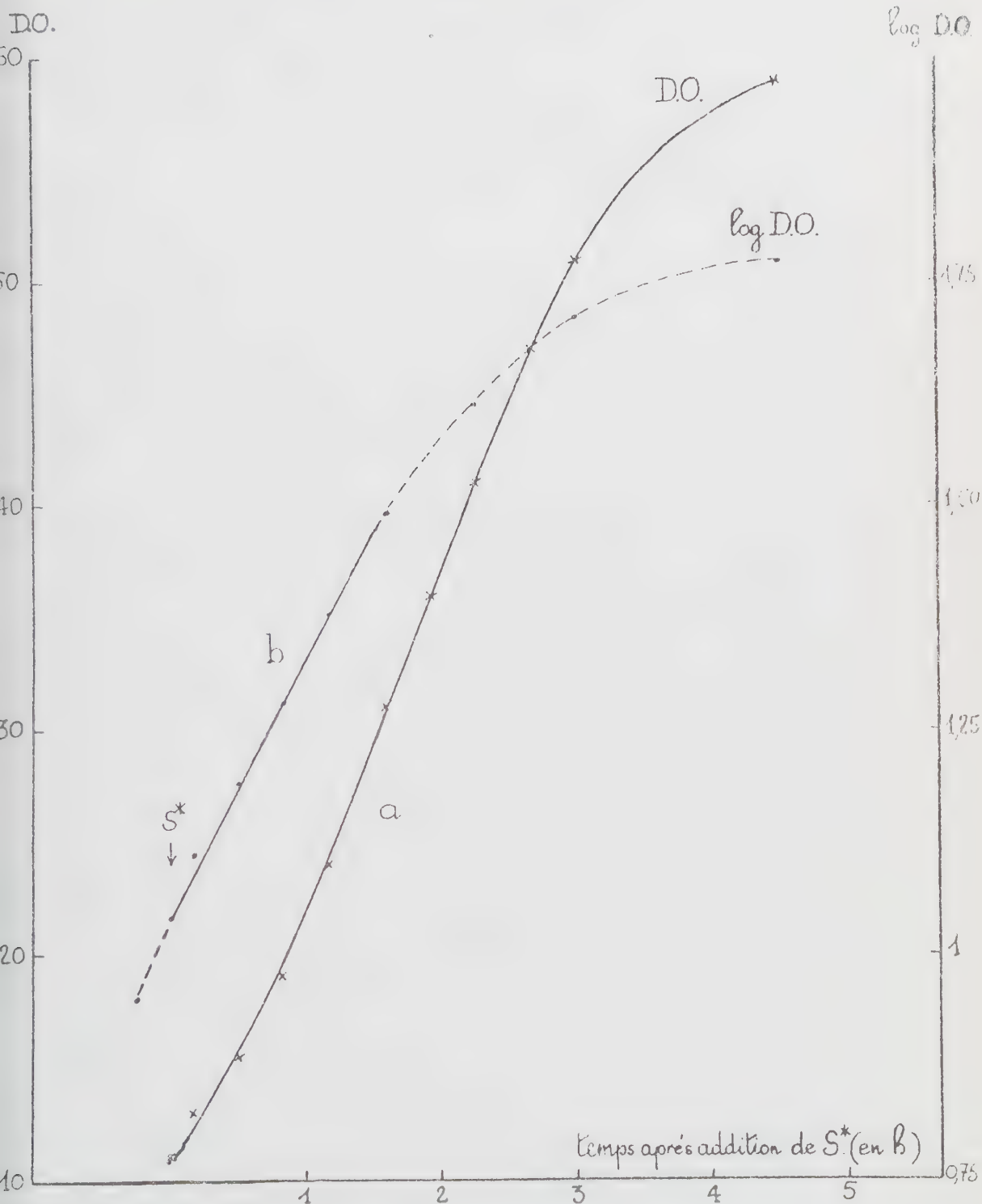
Calculons a pour $t = 1$ h en lisant les D.O. aux temps 0 et 1 sur le graphique n° 9 .



Graphique n° 9

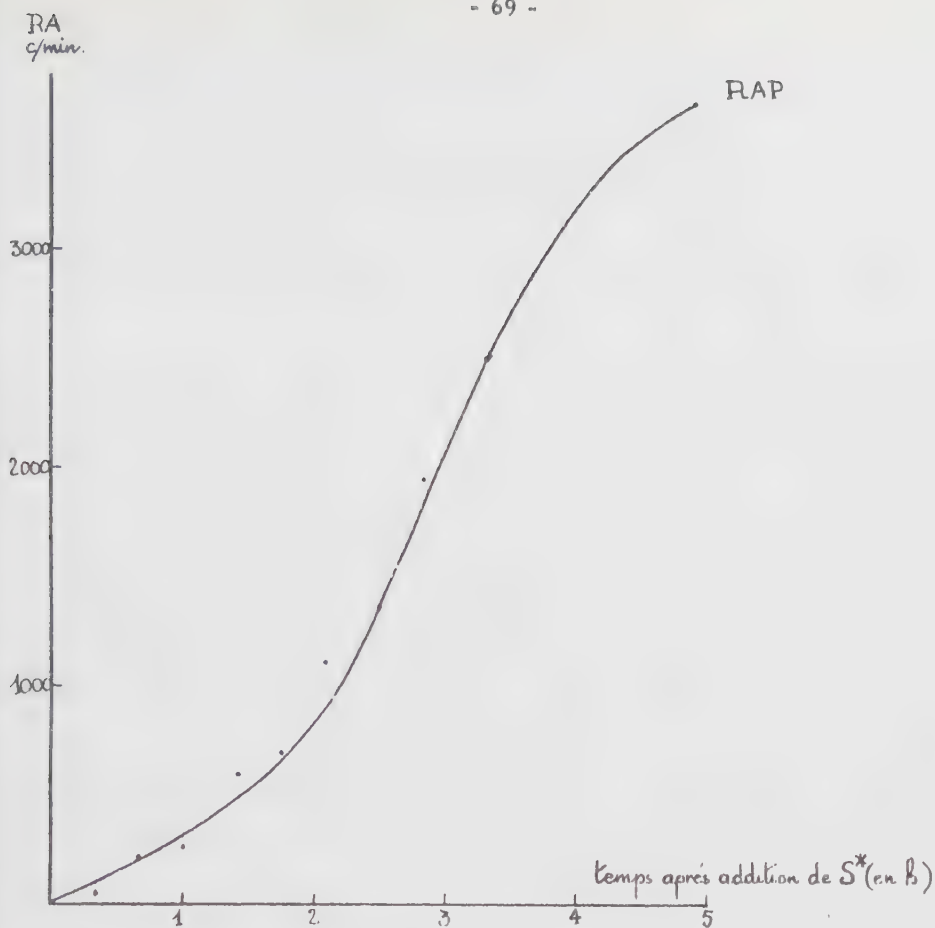
Croissance de *E. coli* SA 5 en milieu S^* sulfamidé à 5 g par litre.

a = représentation habituelle, b = représentation logarithmique.



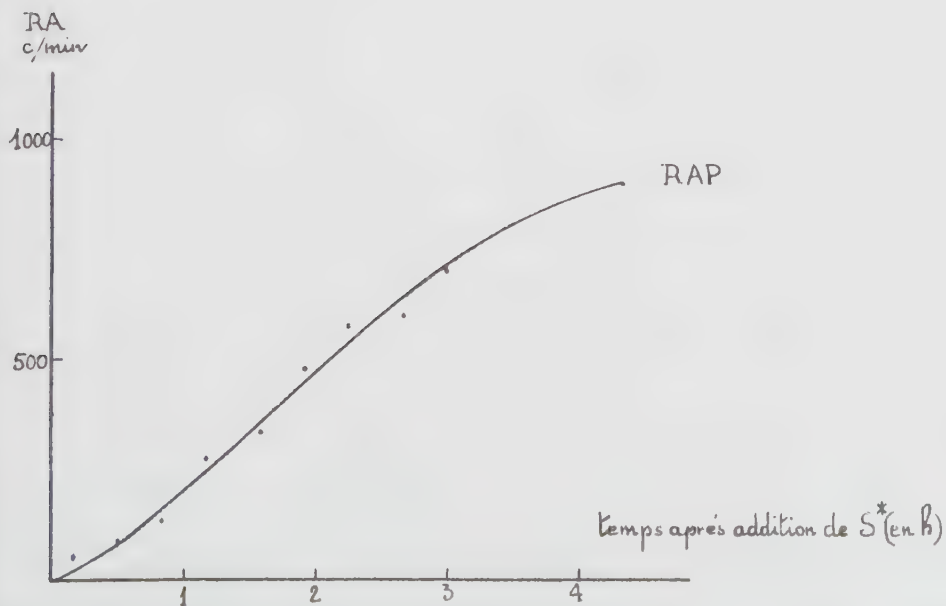
Graphique n° 10

Croissance de *E. coli* SA 5 en milieu $S^* + M$, sulfamidé à 5 g par litre.
 a = représentation habituelle, b = représentation logarithmique.



Graphique n° 11

Incorporation de la radioactivité dans les protéines de E. coli SA 5 en milieu S^*



Graphique n° 12

Incorporation de la radioactivité dans les protéines de E. coli SA 5 en milieu $S^* + M$.

$$e^a = \frac{13}{8} = 1,62 . \text{ D'où nous tirons } a = 0,485 .$$

Calculons X_o à l'aide de l'équation (1) .

Temps en heures	X^* théorique	X^* obtenu expérimentalement	X_o déduit
0,5	$0,275 X_o$	140	510
1	$0,625 X_o$	300	480
1,5	$1,06 X_o$	520	490
2	$1,63 X_o$	840	515
2,5	$2,35 X_o$	1 350	575
moyenne			514

Nous pouvons maintenant calculer le soufre incorporé dans les protéines bactériennes depuis l'addition du traceur . Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Temps en heures	Sp	S initial	S^* calculé	S^* trouvé expérimentalement
0	514	514	0	
0,5	655	514	141	140
1	835	514	321	300
1,5	1 058	514	544	520
2	1 351	514	837	840
2,5	1 721	514	1 207	1 350

Mise à part la valeur obtenue pour $t = 2,5$ les valeurs du soufre incorporé trouvées expérimentalement sont très voisines. Il y a donc bonne corrélation entre l'incorporation du soufre et la croissance en milieu S^* .

b) Milieu $S^* + M$ = incorporation du soufre dans la cystéine

Temps en heures	0	0,5	0,75	1	1,25	1,5
RAP	0	90	150	205	205	330

Calculons a pour $t = 1$ h en lisant les D.O. aux temps 0 et 1 sur le graphique n° 10 .

$$e^a = \frac{21,4}{11} = 1,94 \text{ d'où nous tirons } a = 0,66 .$$

Calculons X_o à l'aide de l'équation (1)

Temps en heures	X^* théorique	X^* obtenu expérimentale- ment	X_o déduit
0,5	$0,39 X_o$	90	231
1	$0,65 X_o$	150	231
1,5	$0,93 X_o$	205	231
2	$1,28 X_o$	270	221
2,5	$1,69 X_o$	330	195
moyenne			220

Calculons maintenant le soufre incorporé dans les protéines bactériennes depuis l'addition du traceur . Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

Temps en heures	S_c	S initial	S^* calculé	S^* trouvé expérimentale- ment
0	220	220	0	
0,5	305	220	85	90
0,75	363	220	143	150
1	424	220	204	205
1,25	501	220	281	270
1,5	591	220	371	330

Il y a donc encore ici bonne correspondance entre le calcul et l'expérience et par conséquent bonne corrélation entre l'incorporation du soufre dans la cystéine et la croissance en milieu SA 5 .

II . E. COLI SA 10

La croissance de E. coli SA 10 en milieu S^* et en milieu $S^* + M$ est représentée sur les graphiques n° 13 et 14 .

En milieu S^* (graphique n° 13) la courbe de croissance est assimilable à une exponentielle durant 4 h 30 après addition du traceur . Le log D.O. passe de 0,90 à 1,50 , ce qui correspond à deux multiplication (voir page 56) .

En milieu $S^* + M$ (graphique n° 14) la croissance ne suit pas une exponentielle exacte durant les premières heures après l'addition du traceur . L'addition ayant été réalisée après 10 h de culture quand D.O. atteignait déjà 12, la croissance a pu être véritablement exponentielle durant une partie de ce temps . Nous avons ainsi des bactéries qui sont trop voisines de la fin de leur croissance .

Incorporation du soufre dans les bactéries

Les graphiques n° 15 et 16 représentent l'augmentation de la valeur de RAP en fonction du temps en milieu S^* et $S^* + M$. Nous en tirons les valeurs de RAP au temps t .

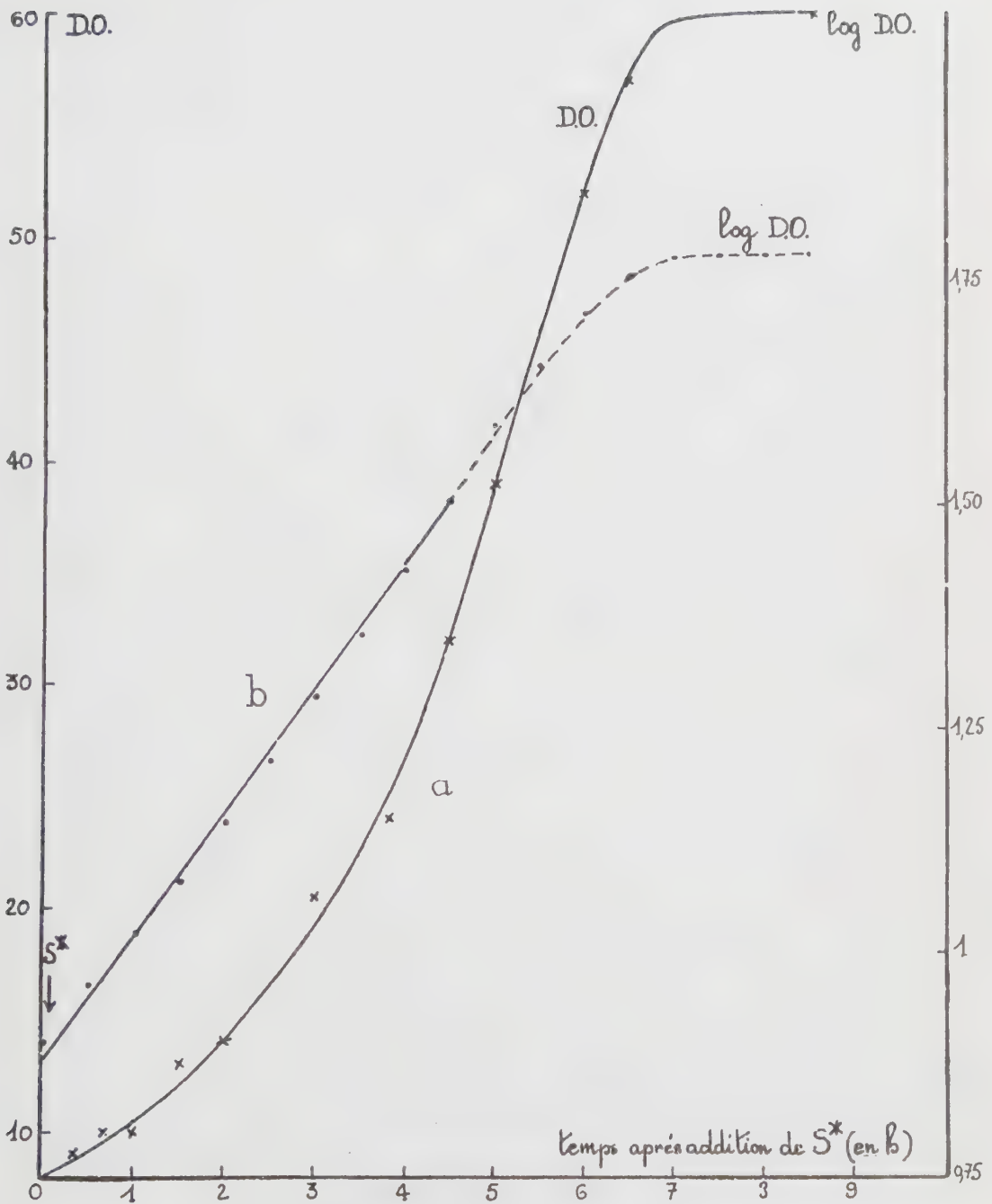
a) Milieu S^* = Incorporation de ^{35}S dans les protéines

Temps en heures	1	2	3	4
RAP	150	330	550	880

Calculons e^{at} pour $t = 1$ h en lisant les D.O. aux temps 0 et 1 sur le graphique n° 13 .

$$e^a = \frac{10,6}{8} = 1,34 \text{ d'où } a = 0,295$$

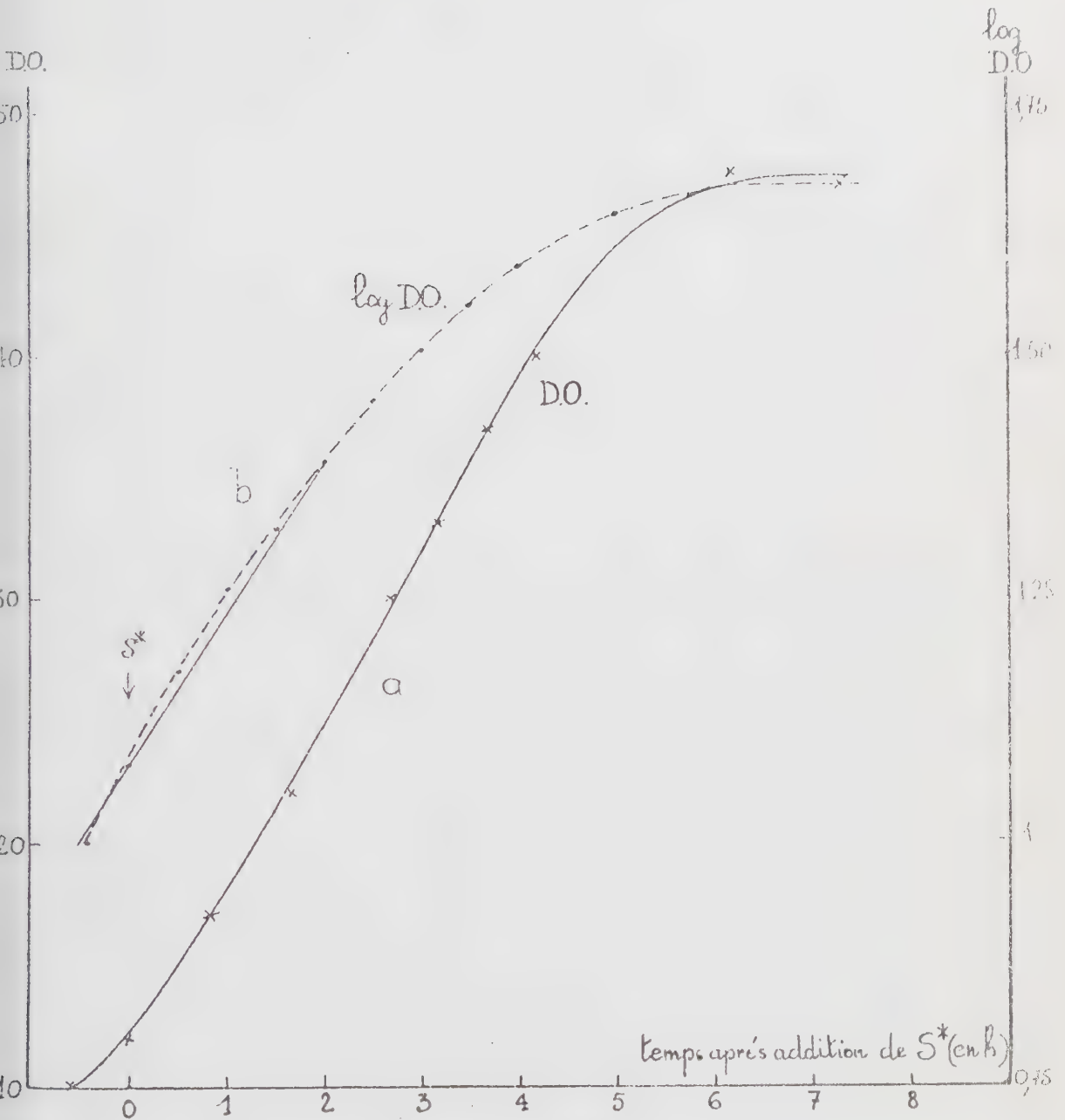
Calculons X_0 d'après l'équation (1)



Graphique n° 13

Croissance de *E. coli* SA 10 en milieu S^* , sulfamidé à 10 g par litre.

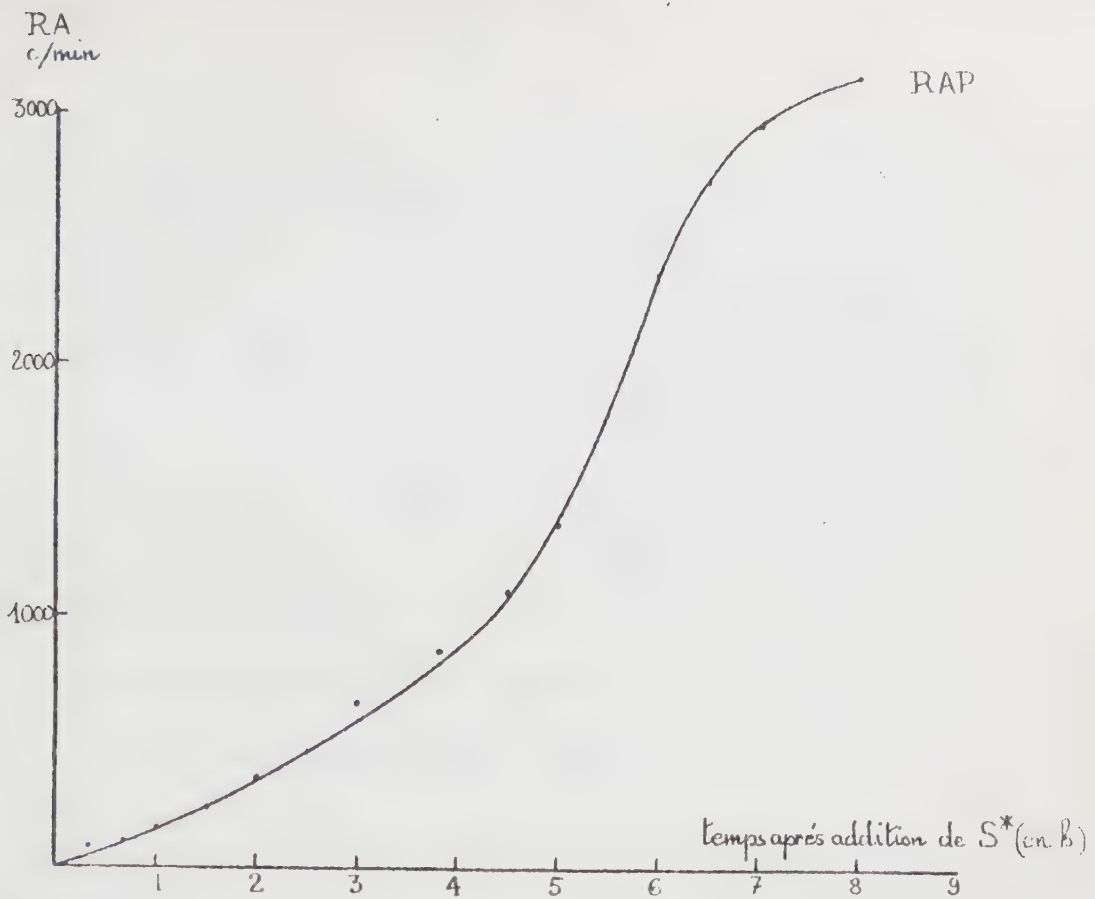
a = représentation habituelle, b = représentation logarithmique.



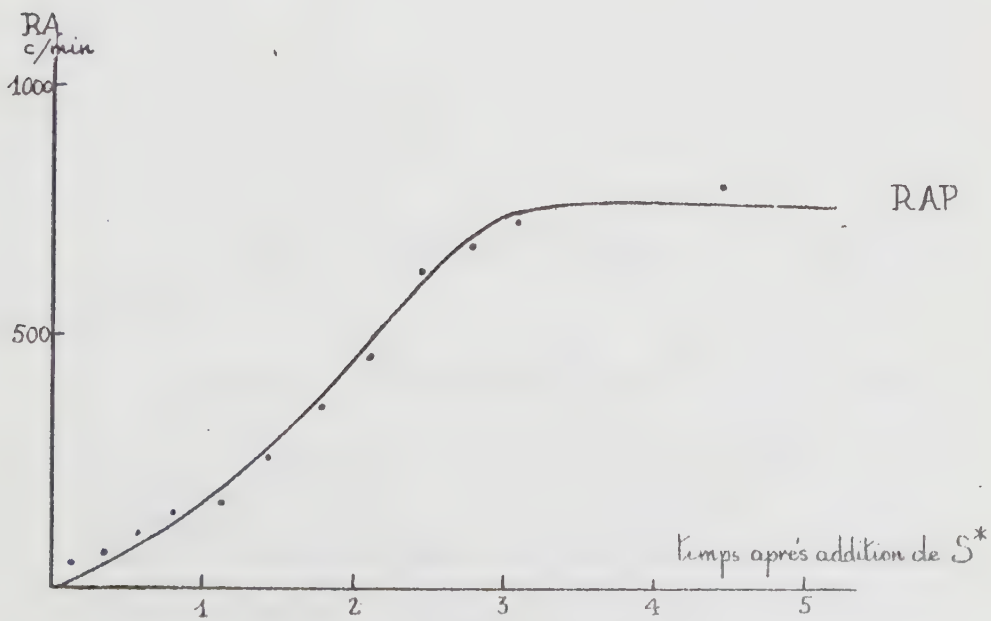
Graphique n° 14

Croissance de *E. coli* SA 10 en milieu S* + M, sulfamidé à 10 g par litre.

a = représentation habituelle , b = représentation logarithmique.



Incorporation de la radioactivité dans les protéines de E. coli SA 10 en milieu S.*



Incorporation de la radioactivité dans les protéines de E. coli SA 10 en milieu S.* + M.

Temps en heures	X * théorique	X * obtenu expérimentale- ment	X _o déduit
1	0,34 X _o	150	441
2	0,80 X _o	330	413
3	1,42 X _o	550	388
4	2,25 X _o	880	392
Moyenne			408

La valeur moyenne de X_o s'établit à 408 .

Calculons maintenant le soufre protéique .

Temps en heures	Sp	S initial	S * calculé	S * trouvé expérimentale- ment
0	408	408	0	
1	546	408	138	150
2	734	408	326	330
3	987	408	579	550
4	1 326	408	918	880

Il y a donc bonne corrélation entre l'incorporation du soufre dans les protéines et la croissance .

b) Milieu S * + M = incorporation de ³⁵S dans la cystéine .

Temps en heures	0,5	1	1,5	2	2,5
RAP	45	100	160	235	325

Ici il semble difficile d'appliquer intégralement les calculs habituels car les valeurs trouvées montrent que la croissance n'a pas été rigoureusement exponentielle (graphique n° 14) .

Nous pouvons cependant faire une approximation en admettant que la croissance reste exponentielle durant 2 h après addition de $^{35}\text{SO}_4^{--}$, ce qui donnerait pour log D.O. les valeurs suivantes déduites du graphique n° 14 .

$$\begin{array}{ll} \text{à } t = 0 & \log \text{ D.O.} = 1,08 \quad \text{D.O.} = 12 \\ t = 1 & \log \text{ D.O.} = 1,235 \quad \text{D.O.} = 17,2 \\ t = 2 & \log \text{ D.O.} = 1,39 \quad \text{D.O.} = 24,6 \end{array}$$

Ce qui nous permet de calculer

$$e^a = \frac{17,2}{12} = 1,43 \quad \text{d'où } a = 0,36$$

$$e^{2a} = \frac{24,6}{12} = 2,05 \quad \text{d'où } a = 0,36$$

Les 2 valeurs de a ainsi calculées sont donc identiques et dans ces conditions nous pouvons appliquer les équations de ROBERTS .

Calculons X_o d'après l'équation (1) page 59 .

Temps en heures	X^* théorique	X^* obtenu expérimentale- ment	X_o déduit
0,5	$0,19 X_o$	45	237
1	$0,43 X_o$	100	232
1,5	$0,71 X_o$	160	225
2	$1,05 X_o$	235	224
2,5	$1,5 X_o$	325	216
Moyenne			226

Calculons maintenant le soufre incorporé dans la cystéine depuis l'addition du traceur .

Temps en heures	Sc	S initial	S * calculé	S * trouvé expérimentale- ment
0	228	226	0	
0,5	228	226	45	45
1	326	226	100	100
1,5	390	226	164	160
2	468	226	242	235
2,5	570	226	344	325

Ici encore nous trouvons une bonne concordance entre valeurs expérimentales et valeurs théoriques . L'incorporation du soufre dans la cystéine suit donc bien la cinétique prévue .

III . CONCLUSIONS

L'incorporation de ^{35}S , tant dans les protéines que dans la cystéine de nos trois souches de bactéries en phase exponentielle, suit la même cinétique que la croissance des bactéries . De ce point de vue il semble donc qu'il n'y ai aucune différence entre les souches résistantes à la sulfanilamide et la souche sensible .

La biosynthèse de la méthionine s'effectue normalement bien que la croissance soit plus lente pour la souche E. coli SA 10 . Il ne semble donc pas probable que la sulfamidorésistance soit due à une augmentation de la biosynthèse de la méthionine .

CHAPITRE VII

TENTATIVE D'ETUDE DU ROLE DE LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE DANS LA RESISTANCE A LA SULFANILAMIDE CHEZ E. COLI.

Bien que non indispensable à la survie des microorganismes, la paroi cellulaire constitue pour ces organismes une importante barrière vis-à-vis du milieu extérieur. Bien plus, par sa composition, la paroi cellulaire peut jouer un rôle capital dans la pénétration de diverses substances à l'intérieur de la cellule. Enfin, il est possible de concevoir une fixation irréversible sur la paroi cellulaire, rendant celle-ci imperméable à la pénétration ultérieure de certaines substances à travers cette paroi.

Il a de plus été montré que l'action inhibitrice des sulfamides se manifestait de façon beaucoup plus intense quand on opérait sur des systèmes enzymatiques isolés des bactéries que sur ces mêmes bactéries intactes.

Ces observations font penser que les sulfamides rencontrent certaines difficultés pour pénétrer dans les cellules. La confirmation de cette hypothèse nécessite donc des investigations sur la perméabilité de E. Coli aux sulfamides (5).

Aussi n'ayant pas décelé de différences entre les bactéries sulfamido-sensibles et sulfamido-résistantes dans nos études sur la biochimie du soufre chez E.coli, nous avons donc tenté d'étudier le rôle des constituants extérieurs au protoplasme, c'est-à-dire le rôle de la membrane bactérienne. Ainsi pour aborder cette étude notre idée directrice fut-elle la suivante : l'élimination de la paroi cellulaire, par un traitement approprié des microorganismes, doit permettre de mettre en évidence le rôle de cette paroi dans la pénétration d'une substance donnée. C'est dans cet esprit que nous avons préparé des protoplastes de E.coli, nous proposant d'étudier l'action de la sulfanilamide sur des colibacilles dépourvus de membranes, et cependant en survie .

I . OBTENTION DE PROTOPLASTES DE E. COLI

De nombreuses techniques de préparation des protoplastes de *E. coli* ont été décrites (30). Ces techniques utilisent différents agents pour la production des protoplastes : lysozyme, phages, pénicilline, glycolle, déficience en acide diaminopimélique. Nous avons choisi de préparer nos protoplastes au moyen de lysozyme car cet agent agit spécifiquement sur la membrane des bactéries qu'il lyse. On obtient ainsi des bactéries qui semblent totalement privées de paroi cellulaire, ce qui n'est pas le cas avec d'autres agents, tels que la pénicilline qui donne des bactéries privées partiellement de leur paroi cellulaire (16).

Le lysozyme agit plus facilement sur les bactéries Gram positif que sur les bactéries Gram négatif. Chez ces dernières l'attaque de la membrane par le lysozyme n'est possible qu'en utilisant certains artifices. Ainsi pour *E. coli*, est-il nécessaire d'agir en présence d'EDTA ou complexon III.

L'action du lysozyme porte sur les sucres acétylaminés de la membrane qu'il libère en même temps que des groupements réducteurs. Cet enzyme est une 1-4- β -N-acétylhexoseaminidase. La présence de liaisons 1-4 entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine rend la paroi cellulaire d'autant plus sensible à l'action du lysozyme que ces liaisons sont plus abondantes (49).

Pour préparer les protoplastes de *E. coli* nous avons utilisé la technique de MAHLER et FRASER (31); ces auteurs obtiennent une lyse rapide de la paroi cellulaire de *E. coli* au moyen du lysozyme à pH 8 en tampon Tris (trihydroxyméthylaminométhane) et en présence d'EDTA.

La nécessité d'ajouter de l'EDTA démontre le rôle des traces d'ions métalliques dans l'action du lysozyme sur la bactérie (44) (45).

Une culture de bactéries en milieu liquide est récoltée par centrifugation et lavée deux fois à l'eau distillée. Le culot bactérien séparé par centrifugation est remis en suspension dans le milieu suivant, en quantité suffisante pour obtenir une densité optique voisine de 0,50 :

Solution de Tris M/10 pH 8	3 ml
Solution de saccharose M	5 ml
Eau distillée	2 ml
Solution de lysozyme à 2mg/ml	0,2 ml

Nous avons utilisé du lysozyme cristallisé, obtenu à partir du blanc d'oeuf et fourni par l'Industrie Biologique Française de Gennevilliers (Seine).

Il est nécessaire de bien mélanger les solutions afin d'obtenir la fixation du lysozyme sur la totalité des bactéries ; ajouter alors :

Solution d'EDTA à 0,8 % pH 8 1 ml

On obtient ainsi des protoplastes en 15 minutes à température ambiante.

Nous avons pu constater que l'addition de saccharose évite la lyse des protoplastes. La formation des protoplastes se traduit par une diminution de la densité optique de la suspension. Cette baisse de turbidité est beaucoup plus marquée si l'on a remplacé la solution de saccharose M par de l'eau distillée. Bien plus si on opère la transformation des bactéries en protoplastes dans un tel milieu, et que l'on additionne la suspension d'une trace d'un corps tensioactif tel que le Duponol (lauryl-sulfate d'ammonium), on obtient une lyse totale des protoplastes. La solution obtenue présente alors une très grande viscosité et une baisse très marquée de densité optique.

Observés au microscope en contraste de phase, nos protoplastes se présentent comme de petites sphères, de quelques microns de diamètre. Leur contour est peu net, et on remarque en leur centre une ou plusieurs (souvent deux) condensations noires se distinguant nettement du protoplasme, qui forme une auréole transparente autour de ces condensations. Cet aspect est nettement distinct de la forme classique en bâtonnet du colibacille. Il reste toujours dans les suspensions de protoplastes un faible pourcentage de bactéries non transformées en protoplastes.

II . UTILISATION DES PROTOPLASTES POUR NOS RECHERCHES

Nous nous proposons d'étudier la fixation de la sulfanilamide sur les protoplastes d'E.coli sulfamido-sensible et sulfamido-résistant. Mais un difficile problème s'est posé à nous quand nous avons tenté de récolter les protoplastes obtenus. En effet ces organismes, du fait même qu'il sont privés de leur paroi cellulaire, sont devenus extrêmement fragiles ; leur traitement par des solutions de lavage hypotoniques, telles que l'eau distillée, est impossible, car elles entraîneraient la lyse totale des protoplastes. Nous avons donc envisagé des lavages avec des solutions de saccharose 0,5 M. Mais dans ce cas si le liquide de lavage n'a pas d'action destructive sur les protoplastes, la centrifugation en milieu saccharose 0,5 M est très longue du fait de la grande densité du liquide ; d'autre part la centrifugation elle-même est très mal supportée par les protoplastes dont une grande partie se trouve détruite par ce traitement. Le culot obtenu, enfin, ne peut que

très difficilement être remis en suspension dans un nouveau volume de solution de saccharose. Dans l'impossibilité de résoudre ces problèmes, nous avons dû abandonner l'espoir d'utiliser comme matériel d'expérience des suspensions pures de protoplastes débarassées des constituants du milieu de lyse. Aussi avons-nous été conduit à envisager le problème sous un angle différent. En effet, on pouvait penser que le protoplaste résistant fixerait beaucoup plus ou beaucoup moins de sulfamide que le protoplaste normal, et que le premier reviendrait plus facilement à la forme bactérienne normale que le second. D'autre part, le passage par la forme protoplaste n'entraînerait-il pas une modification du comportement de la bactérie vis-à-vis de la sulfanilamide ?

Certains auteurs ont décrit des réversions de protoplastes de colibacilles vers la forme bactérienne par simple repiquage sur un milieu sans lysozyme (7).

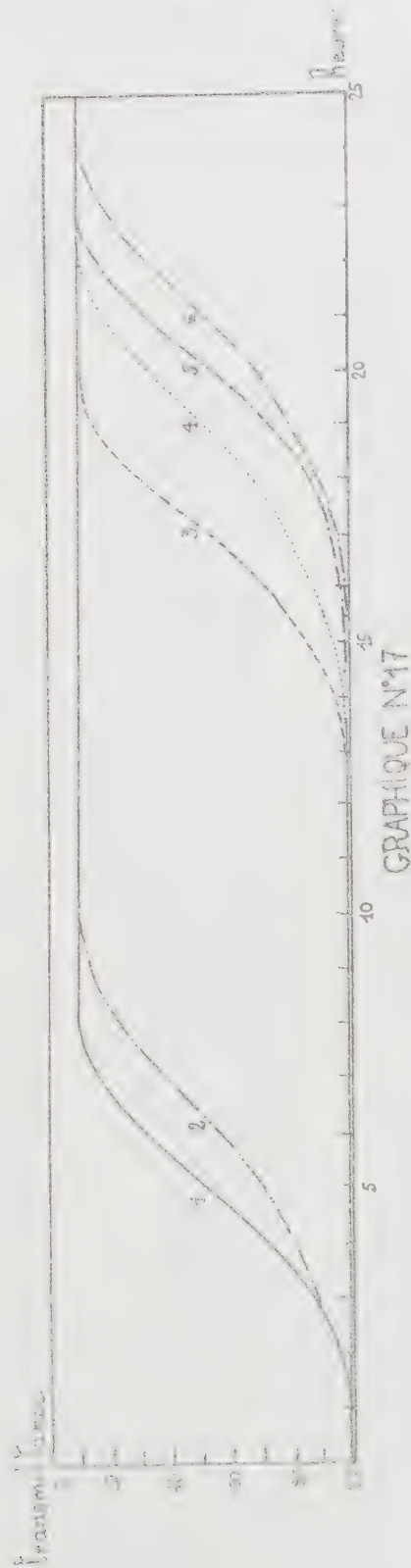
Nous avons donc tenté d'obtenir une réversion protoplastes-bactéries. Pour cela nous avons réalisé les expériences suivantes :

EXPERIENCE N° 1

Une culture de *E. coli* N de 12 à 14 heures, est récoltée puis lavée deux fois stérilement avec une solution de ClNa à 9g/l. Le culot bactérien obtenu est mis en suspension dans l'eau distillée de façon à obtenir une D.O. voisine de 50. Une fraction de cette suspension est mise de côté et servira de témoin ; le reste de la suspension est utilisé pour préparer les protoplastes. La suspension de protoplastes obtenue est divisée en deux parties : l'une est conservée telle quelle, l'autre est additionnée de 0,5 ml de Duponol à 1 % dans l'eau distillée. On obtient une lyse des protoplastes. Chacune des trois suspensions est alors diluée au centième, respectivement dans du milieu N et du milieu N saccharosé 0,5 M (NS 0,5 M), ceci afin de prévenir une cytolysse des protoplastes dans ce cas. Ces dilutions sont alors utilisées comme inoculum pour ensemercer des fioles contenant du milieu N ou NS 0,5 M, suivant que l'inoculum a été préparé en milieu N non saccharosé ou N saccharosé. L'expérience est conduite au biophotomètre de Bonét-Maury et Jouan. Chaque fiole contenant un même volume de milieu est ensemencée avec un même volume d'inoculum. La culture est réalisée sans barreau aimanté afin d'éviter la destruction des protoplastes par agitation (graphique n° 17).

Le même code de représentation graphique est utilisé pour toutes les expériences d'enregistrement de croissance bactérienne au biophotomètre.

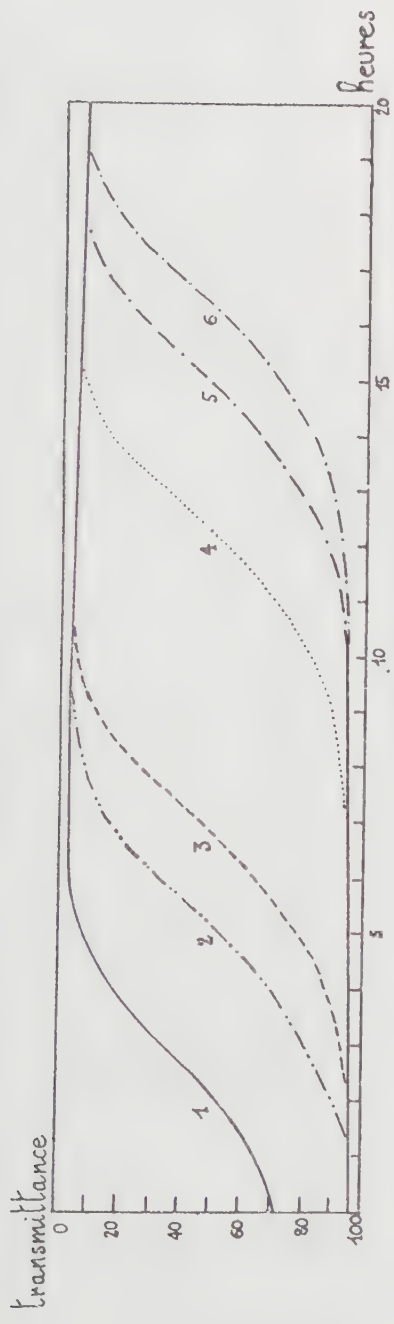
fiole 1 — fiole 4
 fiole 2 — fiole 5 —
 fiole 3 — fiole 6 —



Graphique n° 17

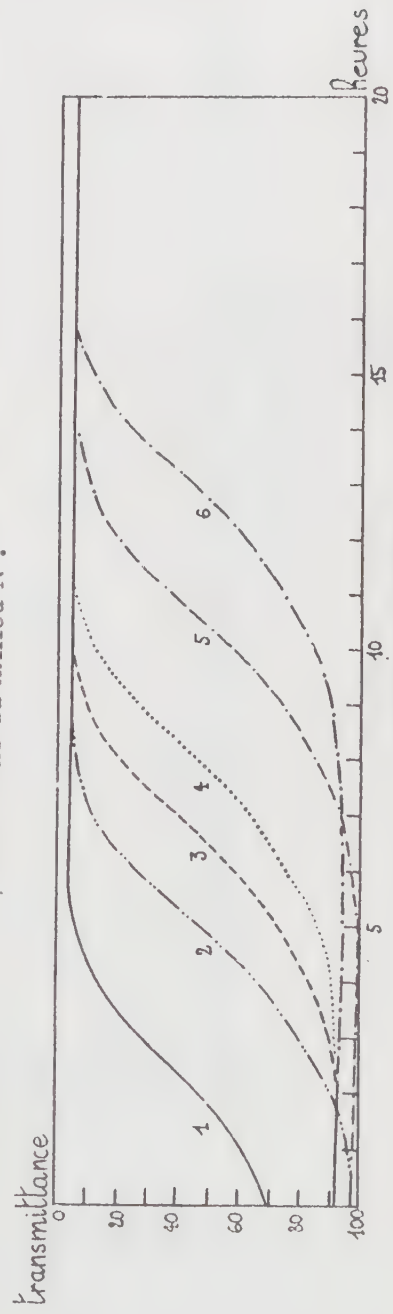
Courbes de croissance correspondant à l'expérience n° 1

Fiole 1 : Milieu N ensemencé avec les bactéries témoins diluées au 1/100 dans le milieu.
 Fiole 2 : Milieu NS 0,5 M ensemencé comme la fiole 1. Fiole 3 : Milieu N ensemencé avec
 des protoplastes dilués au 1/100 dans le milieu NS 0,5 M. Fiole 4 : Milieu NS 0,5 M ense-
 mencé comme la fiole 3. Fiole 5 : Milieu N ensemencé avec des protoplastes dilués au
 1/100 dans le milieu NS 0,5 additionné de Duponol. Fiole 6 : Milieu NS 0,5 M ensemencé
 comme la fiole 5.



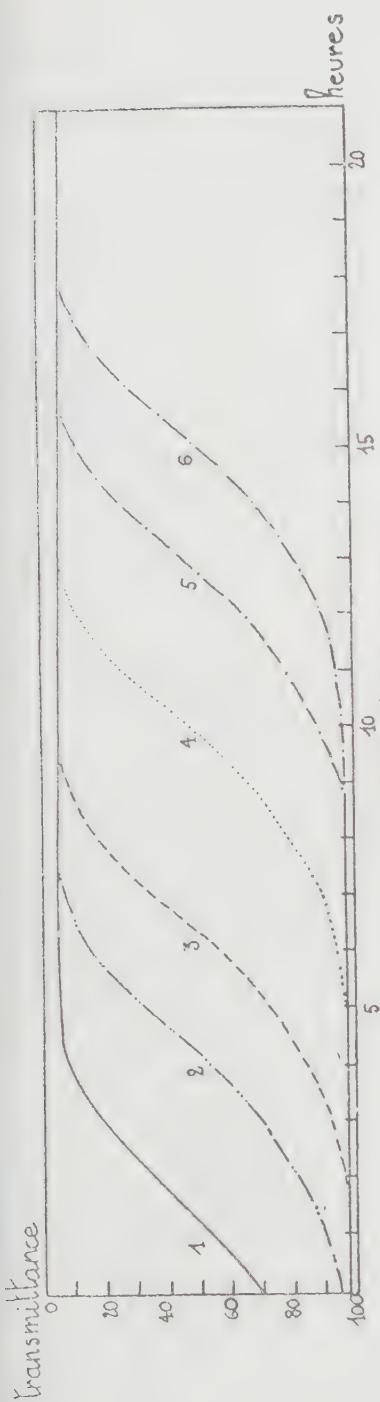
GRAPHIQUE N° 18a
Graphique n° 18 a

Courbes de croissance correspondant à l'expérience n° 2.
Fioles 1, 2 et 3 : Milieu Nensemencé avec les bactéries témoins diluées respectivement au 1/10, 1/100 et 1/1 000 dans du milieu N.
Fioles 4, 5 et 6 : Milieu Nensemencé avec des protoplastes dilués respectivement au 1/10, 1/100 et 1/1 000 dans du milieu N.



GRAPHIQUE N° 18b
Graphique n° 18 b

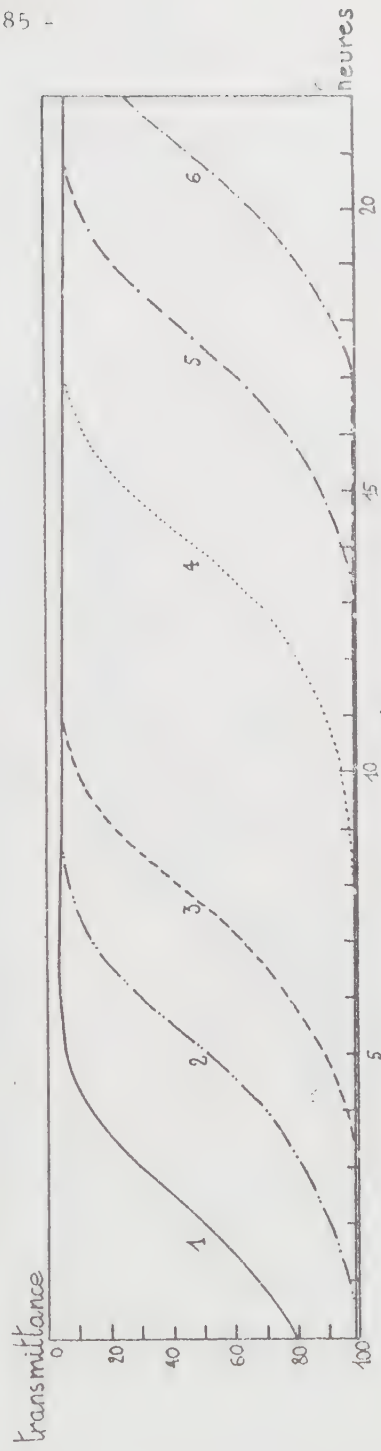
Voir légende au graphique n° 18 a ; mais ici les ensemencements ont été faits avec des bactéries et des protoplastes dilués dans du milieu NS 0.5 M.



GRAPHIQUE N° 18 c

Graphique n° 18 c

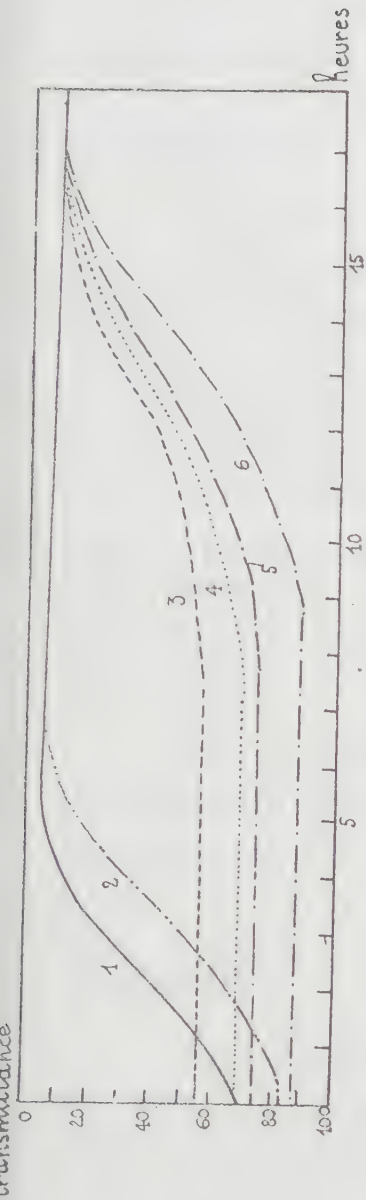
Voir légende au graphique n° 18 a ; mais ici les ensemcements ont été faits avec des bactéries et des protoplastes dilués dans de l'eau distillée



GRAPHIQUE N° 18 d

Graphique n° 18 d

Voir légende au graphique n° 18 a : mais ici les ensemcements ont été faits avec des bactéries et des protoplastes dilués dans de l'eau distillée additionnée de Dapsonol .



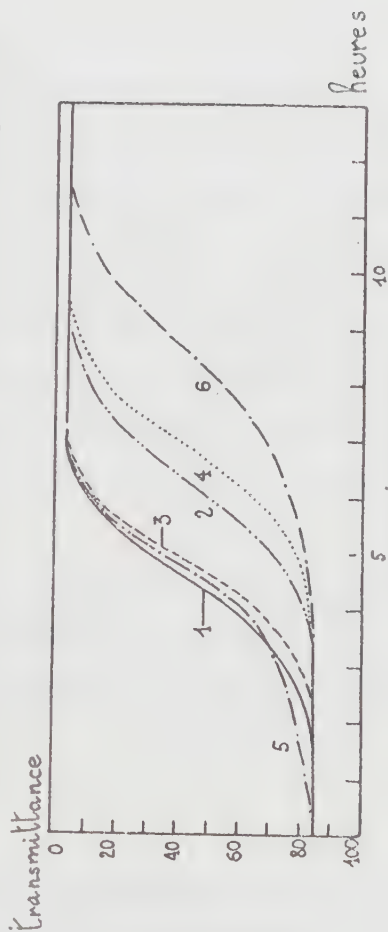
GRAPHIQUE N°19

Graphique n° 19

Courbes de croissance correspondant à l'expérience n° 3. Toutes les fioles contiennent du milieu N.

Les fioles 1 et 2 sontensemencées avec des bactéries témoins.

Les fioles 3, 4, 5 et 6 sontensemencées avec des protoplastes.



GRAPHIQUE N°20

Graphique n° 20

Toutes les fioles sontensemencées avec des bactéries normales.

Fiole 1 : milieu N

Fiole 2 : milieu NS, 0,5 M

Fiole 3 : milieu N + C, 5 ml de Duponol à 1 %

Fiole 4 : milieu NS 0,5 M + 0,5 ml de Duponol à 1 %

Fiole 5 : milieu N + 1 ml DDTA 0,8 %

Fiole 6 : milieu N + 0,2 ml de lysozyme à 2 mg/ml

Nous constatons que les bactéries témoins non traitées au lysozyme, poussent normalement ; la croissance débutant dès l'inoculation. Par contre les fioles ensemencées avec les protoplastes montrent qu'après une longue période de latence, le développement bactérien se poursuit normalement. Nous notons que la croissance en milieu saccharosé est un peu moins rapide qu'en milieu normal. A l'examen microscopique des cultures nous n'observons que des formes bactériennes d'aspect classique.

EXPERIENCE N° 2

Une culture de E.coli N récoltée et lavée dans les mêmes conditions que précédemment puis amenée à une D.O. de 50 environ est séparée en deux fractions : l'une servira de témoin (bactéries intactes) l'autre est transformée en protoplastes. La suspension de protoplastes obtenue est ensuite séparée en 4 fractions destinées à être diluées respectivement dans du milieu N, du milieu NS 0,5 M, de l'eau distillée et de l'eau distillée + Duponol (traces). Les dilutions de ces 4 fractions sont faites au dixième, au centième, au millième et servent à ensemercer les fioles du biophotomètre, avec un égal volume d'inoculum pour chaque fiole. Ces fioles contiennent toutes du milieu N. Les bactéries intactes servant de témoin sont diluées et ensemencées dans les mêmes conditions que les protoplastes (graphique n° 18 a, 18 b, 18 c et 18 d).

Nous observons comme dans le cas de la première expérience un retard de croissance pour les fioles ensemencées avec des protoplastes. Ce retard est toujours du même ordre, quel que soit le milieu dans lequel ont été dilués les protoplastes.

EXPERIENCE N° 3

Nous ensemençons les fioles du biophotomètre contenant du milieu N avec des volumes croissants d'une suspension de protoplastes. Nous ensemençons parallèlement des témoins de bactéries non traitées au lysozyme (graphique n° 19) : nous observons toujours le même retard de croissance entre protoplastes et bactéries.

Puisque nous sommes obligés d'utiliser comme inoculum de protoplastes une suspension de ces derniers dans leur milieu de préparation, nous avons vérifié que les diverses substances entrant dans la composition de ce milieu n'entravaient pas de façon importante le développement bactérien. Pour cela nous avons inoculé des bactéries dans du milieu N additionné des divers constituants utilisés pour la préparation des protoplastes. Nous n'avons noté d'action inhibitrice pour aucun de ces constituants (graphique n° 20).

DISCUSSION

La croissance que nous observons dans les fioles ensemencées avec des protoplastes ne semble pas être due à un retour de ces protoplastes vers leur forme bactérienne primitive. En effet si un tel phénomène se produisait, nous devrions obtenir une croissance parallèle des protoplastes et des témoins bactéries intactes. En particulier, les protoplastes traités au Duponol ne devraient fournir aucune croissance puisque totalement lysés par ce traitement. Au contraire nous obtenons une croissance tout à fait semblable à celle que nous observons en l'absence de traitement au Duponol (abstraction faite du retard noté au départ des cultures à partir de suspensions de protoplastes). Nous pensons donc que la croissance retardée que nous avons observée est due uniquement à la multiplication des bactéries résiduelles non attaquées par le lysozyme. Nous avons en effet signalé qu'il persistait toujours après traitement au lysozyme un certain pourcentage de bactéries résistantes à ce traitement. Ce fait est bien confirmé par l'expérience n°2,

N'ayant pas obtenu de réversion en milieu liquide, nous avons tenté d'en obtenir une en milieu solide. Nous avons ensemencé des protoplastes sur gélose en boîte de Pétri et entre lame et lamelle afin de suivre au microscope l'évolution de la préparation. Nous n'avons jamais observé une croissance en rapport avec la quantité de protoplastes ensemencés. Nous n'avons d'autre part pas observé de formation de colonies de bactéries ou de protoplastes à partir des protoplastes ensemencés, les seules colonies obtenues ne pouvant être rapportées qu'à la présence des bactéries résiduelles de l'inoculum.

Dans ces conditions, nous n'avons pu aborder l'étude du rôle de la membrane dans la pénétration de la sulfanilamide au sein du protoplasme bactérien.

CONCLUSIONS

Nous avons dans notre introduction fait le point des connaissances actuelles sur la Biochimie du soufre. Nous avons vu par quel processus les microorganismes synthétisaient acides aminés et peptides soufrés à partir de diverses sources de soufre. Nous avons en particulier souligné le rôle des composés foliques dans la biosynthèse de la méthionine et la possibilité d'inhiber la synthèse de l'acide folique au moyen des sulfamides. Nous avons vu que si le mécanisme exact de cette inhibition était connu le problème de la résistance aux sulfamides n'était pas encore élucidé.

Le problème à la solution duquel nous nous sommes attaché dans notre travail est le suivant : la sulfamidorésistance peut-elle être attribuée à une modification du taux de synthèse de la méthionine, étant donné que celle-ci est douée de propriétés antisulfamides ?

Dans le chapitre I, nous avons défini les souches que nous avons utilisées, le milieu sur lequel nous les avons cultivées ainsi que la technique qui nous a permis d'évaluer la croissance des bactéries. Puis nous avons envisagé les problèmes posés par l'utilisation du ^{35}S .

Enfin nous avons étudié l'influence de la nature de différentes sources de soufre sur le métabolisme des acides aminés soufrés chez *E. coli*.

Dans le chapitre II, nous avons étudié la fixation de la méthionine et de la cystine par *E. coli* et nous avons constaté que ces deux acides aminés étaient incorporés dans les protéines bactériennes. La cystine étant incorporée également dans le glutathion.

Dans le chapitre III, nous avons étudié la synthèse des acides aminés soufrés chez *E. coli* N. Nous avons constaté que le taux de méthionine synthétisée par cette souche est constant dans différentes conditions expérimentales.

Dans le chapitre IV, nous avons étudié le taux de cette synthèse chez nos souches sulfamido-résistantes et nous avons montré qu'il était comparable à celui de la souche sulfamido-sensible.

Dans les chapitres V et VI, nous avons comparé la cinétique de l'incorporation du soufre dans les protéines de *E. coli* sulfamido-sensible et de *E. coli* sulfamido-résistant. Nous avons montré que dans les deux cas l'incorporation du soufre suivait une même loi cinétique et que par conséquent la biosynthèse de la méthionine ne s'effectue pas à un taux différent dans la souche sensible et dans les souches résistantes.

Enfin au chapitre VII, nous avons tenté sans succès de déterminer le rôle de la perméabilité cellulaire dans la sulfamido-résistance par emploi de protoplastes.

Les diverses constatations que nous avons pu faire montrent qu'il n'y a pas de modification du taux de synthèse de la méthionine chez *E. coli* rendu résistant à la sulfanilamide, et que la résistance ne peut être attribuée à un excès de méthionine, bien que celle-ci soit douée de propriétés antisulfamides.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ABRAHAM A., BACHHAWAT B.K., Biochem. Biophys. Acta. 1963, 70, 104-6.
Effect of light and streptomycine on the incorporation of sulfate
into sulfolipides in *Euglena gracilis*.
- 2 - BLACK S. Ann. Rev. Biochem. 1963, 32, 399-418. The biochemistry of
sulfur containing compounds.
- 3 - BOLTON E. T., BRITTEN R. J., COWWIE D. B., LEAHY, Mc CLURE,
ROBERTS R. B.
Year Book - Carnegie Institution of Washington 1956 ; 57.
- 4 - BONNEL P. H. Ann. Biol. Clin. 1951, 9, 410-14. Obturation des tubes de
milieu de culture au moyen d'une capsule en aluminium.
- 5 - BROWN G. M. J. Biol. Chem. 1962, 237, 536-46. The biosynthesis of
folic acid. II. Inhibition by sulfonamides.
- 6 - CATHOU R. E., BUCHANAN J. M. J. Biol. Chem. 1963, 238, 1746-51.
Enzymatic synthesis of the methyl group of methionine.
- 7 - CHARGAFF E., SCHULMAN H. M., SHAPIRO H. S. Nature. 1957, 180, 851-52.
Protoplasts of *E. coli* as sources and acceptors of deoxypentose
nucleic acid : rehabilitation of a deficient mutant.
- 8 - CLAYTON R. A., STRONG F. M. Analyt Chem. 1954, 26, 1362-64.
New solvent system for separation of aminoacids by paper chromatography.
- 9 - COWIE D. B., BOLTON E. T., SANDS M. K. J. Bact. 1950, 60, 233-48.
Sulfur metabolism in *E. coli* : I. Sulfate metabolism of normal and
mutant cells.
- 10 - COWIE D. B., BOLTON E. T., SANDS M. K. J. Bact. 1951, 62, 63-74.
Sulfur metabolism in *E. coli* : II; Competitive utilization of labelled and non label-
led sulfur compounds.
- 11 - COWIE D. B., BOLTON E. T. J. Bact. 1952, 64, 87-96.
Sulfur metabolism in *E. coli* : IV. Influence of non methionine sulfur compounds
upon a methionine requiring mutant.
- 12 - DENT C. E. Biochem. J. 1948, 43, 169-80. A study of the behaviour of some
sixty aminoacids on filter paper chromatograms.
- 13 - ELDJARN L., NYGAARD O. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1954, 6, 160-7.
Comments on methods in biological works S^{35} labelled compounds.
- 14 - FAHRENBACH M. J. Ciba Found. Symp. on Chem. and Biol. of Pteridines.
1954, 8, 173-79. Sulphonamide derivatives of Pteridines.
- 15 - GREGORY J. D., ROBBINS P. W. Ann. Rev. Biochem. 1960, 29, 347-61.
Metabolism of sulfur compounds (sulfate metabolism).

- 16 - GUILLAUME J., MARTIN G., DERIEUX J. C. Ann. Inst. Past. Lille, 1948, 10, 159-78. Etude comparative des sphéroplastes de E. coli induits au moyen de la pénicilline et du glycocolle.
- 17 - HARRIS J. S., KOHN H. I. J. Pharmacol. 1941, 73, 385-400.
On the mode of action of the sulfonamides. II. The specific antagonism between methionine and the sulfonamides in E. coli.
- 18 - HARRIS J. S., KOHN H. I. J. Biol. Chem. 1941, 141, 989-90.
The effect of purines on the action of sulfonamides.
- 19 - HOSSACK D. J. N. Ann. Inst. Past. 1962, 103, 866-75.
Etude sur la relation entre la structure chimique et l'activité antibactérienne des dérivés sulfamidiques.
- 20 - HUANG H. T. Biochemistry. 1963, 2, 296-8. Accumulation of homolanthionine by an E. coli mutant.
- 21 - JUKES T. H., BROQUIST H. P. In Metabolic Inhibitors 1963, vol I. Sulfonamides and Folic acid antagonists. Academic Press New York.
- 22 - KAMEN M. D. Radioactive tracers in biology. 1951. Academic Press New York.
- 23 - KISLIUK R. L., WOODS D. D. Biochem. J. 1960, 175, 467-77. Interrelationships between folic acid and cobalamine in the synthesis of methionine by extracts of E. coli.
- 24 - LANDY M., LARKUM N. W., OSWALD E. J., STREIGHTOFF F. Science. 1943, 97, 265-67. Increased synthesis of p. aminobenzoic acid associated with the development of sulfonamide resistance in S. aureus.
- 25 - LARRABEE A. R., ROSENTHAL S., CATHOU R. E., BUCHANAN J. M. J. Biol. Chem. 1963, 238, 1025-31. Enzymatic synthesis of methyl group of methionine.
- 26 - LEDERER E. Chromatographie en chimie organique et biologique. vol III. 1960. Masson éditeur. Paris.
- 27 - LURIA S. E. in The Bacteria, vol I. 1960. The bacterial protoplasm : composition and organization. Academic Press New York.
- 28 - LYSYL I., ZAREMBO J. E. Anal. Chem. 1958, 30, 428-30. Rapide quantitative determination of sulfur in organic compounds.
- 29 - MACHLIN L. J., PEARSON P. B., DENTON C. A., BIRD H. R. J. Biol. Chem. 1953, 205, 213-19. The utilization of sulfate sulfur by the laying hen and its incorporation into cystine.
- 30 - Mc QUILLEN K. in The Bacteria, vol I. 1960. Bacterial protoplasts. Academic Press New York.
- 31 - MAHLER H. R., FRASER D. Biochem. Biophys. Acta. 1956, 22, 197-99.
Reproduction of bacteriophage T3 in protoplasts of E. coli B.

- 32 - MANDEL H. G., ALTMAN R. L. J. Biol. Chem. 1960, 235, 2029-35.
The depression of the incorporation of sulfur aminoacids into *Bacillus cereus*.
by 8 Azaguanine.
- 33 - MAW A. J. Inst. Brewing. 1960, 66, 162-7. Utilization of sulfur compounds
by a brewer's yeast.
- 34 - MAW A. J. inst. Brewing. 1961, 67, 57-63, Effects of cysteine and other
thiols on the growth of a brewer's yeast.
- 35 - MAW A. J. Gen. Microbiol. 1961, 25, 441-49. Ability of S-methyl-L-
cysteine to annul the inhibition of yeast growth by L-ethionine and S-ethyl-
L-cysteine.
- 36 - NAKAMURA T., SATO R. Biochem. J. 1963, 86, 328-35, Synthesis from
sulphate and S-sulfocysteine by a mutant strain of *Aspergillus nidulans*.
- 37 - PASTERNAK C. A. Biochem. J. 1962, 85, 44-9. Sulphate activation and
its control in *E. coli* and *B. subtilis*.
- 38 - PECK H. D. Bact. Rev. 1962, 26, 67-94. Metabolism of inorganic
sulfur compounds.
- 39 - PFEFFER M., SHAPIRO S. K. Bioch. Biophys. Res. Comm. 1962, 9, 405.
Biosynthesis of methionine from S-adenosylmethionine in *E. coli*.
- 40 - PIERFITTE M. Thèse Pharmacie. Nancy 1959. Contribution à l'étude de la
résistance bactérienne aux sulfamides. Comparaison de quelques métabolismes
chez *E. coli* sensible et résistant à la sulfanilamide.
- 41 - PIGG J. C., SPENCE K. D., PARKS L. W. Arch. Biochem. Biophys. 1962,
97, 491-96 .. Methionine biosynthesis in Yeast.
- 42 - POUTEAU-THOUVENOT M. Thèse pharmacie Nancy 1951. Action de la
sulfanilamide et de l'association sulfamido-phénol sur quelques processus
métaboliques d'*E. coli*.
- 43 - PRESCOTT J. M. J. Bact. 1961, 82, 724-28. Utilization of sulfur compounds
by *Streptococcus brevis*.
- 44 - REPASKE R. Biochim. Biophys. Acta. 1956, 22, 189. Lysis of gram-
negative bacteria by lysozyme.
- 45 - REPASKE R. Biochem. Biophys. Acta. 1958, 30, 225. Lysis of gram-
negative organisms and the role of versene.
- 46 - ROBERTS R. B., ABELSON P. H., COWWIE D. B., BOLTON E. T.,
BRITTEN R. J.
Studies of biosynthesis in *E. coli*. Carnegie Inst. Washington.
Publ. 607. 1955.
- 47 - ROWBURY R. J., WOODS D. D. J. Gen. Microbiol. 1961, 24, 120-44.
Further studies on the repression of methionine synthesis in *E. coli*.

- 48 - ROWBURY R. J., Biochem. J. 1962, 82, 24 P. Control of cystathionine formation in E. coli by methionine.
- 49 - SALTON M. R. J., PAVLIK J. G. Biochem. Biophys. Acta. 1960, 39, 398-407. Wall composition and sensitivity to lysozyme.
- 50 - SCHNEIDER W. C. J. Biol. Chem. 1945, 161, 293-303. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid.
- 51 - SCHWEITZER G. K., NEHLS J. W. J. Phys. Chem. 1952, 56, 541-44. Variables in the self absorption of low-energy beta particles.
- 52 - SCHWEITZER G. K., ELDRIDGE J. S. Anal. Chim. Acta. 1957, 16, 189-93. Reproducibility of radioactive sample preparation techniques.
- 53 - SEVAG M. G., ISHII K. Proc. Roy. Soc. B. 1958, 149, 63-81. Drug induced reversible and irreversible enzyme alteration underlying drug resistance.
- 54 - SEVAG M. G., YOKOTA T. Proc. Roy. Soc. B. 1960- 1961. 153, 205. Evolution of the phenomenon of drug resistance.
- 55 - SHAPIRO S. K., SCHLENK F. Adv. Enzymol. 1960, 22, 237-74. The biochemistry of sulfonium compounds.
- 56 - SHIVE W., ROBERTS E. C., J. Biol. Chem. 1946, 162, 463-71. Biochemical transformations as determined by competitive analogue-metabolite growth inhibitions. II. Some transformations involving p. aminobenzoic acid.
- 57 - SHIVE W., SKINNER C. G. In Metabolic Inhibitors. Vol I, 1963. Aminoacids analogues.
- 58 - STERNBERG J., PASCOE E., MERCIER A. Ann. Inst. Past. 1962, 104, 562-89. Incorporation du soufre minéral radioactif $^{35}\text{SO}_4$ dans le B. C. G.
- 59 - STOKSTAD E. L. R. in Ann. Rev. Biochem. 1962, 31, 463-83. The biochemistry of the watersoluble vitamins.
- 60 - STROMINGER J. L. in The Bacteria, vol III, 1962. The biosynthesis of bacterial cell walls. Academic Press, New York.
- 61 - SZULMUJSTER J., WOODS D. D. Biochem J. 1960, 75, 3-12. The synthesis of methionine from homocysteine by enzymatic extracts of E. coli.
- 62 - TABONNE J., NITTI F., SENEGAL M., MOUSSET H. Ann. Inst. Past. 1943. 69, 253-56. Etudes sur le pouvoir antisulfamide. VII. Comportement des protéines et de leurs produits d'hydrolyse enzymatique vis-à-vis des sulfamides.
- 63 - TSUKAMURA S. Japan J. Tuberculos. 1962, 10, 15-24. Sulfur metabolism in Mycobacterium in relation to protein synthesis.
- 64 - UMBARGER E., DAVIS B. D. in The Bacteria, vol III, 1962. Biosynthetic pathways of aminoacid biosynthesis.

- 65 - VERDEIL H. Thèse Pharmacie. Bordeaux. 1954. Sur le dosage de la cystéine dans les protéines.
- 66 - WALKENSTEIN S. S., KNEBEL C. M. Anal. Cham. 1957, 29, 1516-17.
Method for routine determination of sulfur 35 in biological material.
- 67 - WIJESUNDERA S., WOODS D. D. J. Gen. Microbiol. 1960, 22, 229-41.
Suppression of methionine synthesis in E. coli by growth in the presence of this aminoacid.
- 68 - WILSON L. G., BANDURSKI R. S. J. am. Chem. Soc. 1.958, 80, 5576-77.
Enzymatic reduction of sulfate.
- 69 - WOODS D. D., FILDES P. Chem et Indust. 1940, 59, 133-34.
The antisulfamide activity (in vitro) of p. aminobenzoic acid and related compounds.
- 70 - WOODS D. D. Ciba Found. Symp. on Chem. and Biol. of Pteridines.
1954, 8, 220-36. Metabolic relation between p. aminobenzoic acid and folic acid in microorganisms.
- 71 - YOUNG R. J., KIHARA H. K., HALVORSON H. O. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.
1961, 47, 1415-23. Studies on the kinetics of protein synthesis in yeast.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS UTILISEES	1
INTRODUCTION	2
I . <u>Métabolisme du soufre</u>	3
A . Diverses formes du soufre chez les êtres vivants	3
B . Sources de soufre chez les microorganismes	4
C . Processus de l'utilisation du sulfate par les microorganismes	5
a) Biosynthèse de la cystéine	6
b) Biosynthèse du glutathion	6
c) Biosynthèse de la méthionine	7
d) Contrôle de la synthèse de la méthionine chez les microorganismes	9
II . <u>Mode d'action des sulfamides</u>	10
III . <u>Problèmes généraux concernant la résistance bactérienne aux sulfamides</u>	12
CHAPITRE I	
TECHNIQUES GENERALES UTILISEES	14
I . <u>Généralités : souche utilisée, milieu de culture, mesure de la croissance bactérienne</u>	14
A . Souches	14
B . Milieu de culture	14
C . Méthodes de culture	15
D . Mesure de la croissance	16
II . <u>Utilisation de l'isotope radioactif ³⁵S</u>	19
A . Milieu radioactif utilisé . Mesure de la radioactivité et récolte des bactéries	19
a) Milieu	19
b) Mesure de la radioactivité	20
c) Récolte des bactéries	21
1) Centrifugation	21
2) Filtration sur membrane	22

B . Extraction fractionnée des bactéries	23
III . <u>Influence de la nature sous laquelle le soufre se trouve dans le milieu sur la synthèse des acides aminés soufrés</u>	24
A . Nature des sources de soufre fournies à E. coli dans nos expériences	24
B . Hydrolyse et chromatographie	25
C . Vérification de la pureté du sulfate utilisé	26

CHAPITRE II

ORIGINE DU SOUFRE DES PROTEINES DE E. COLI SUIVANT LA NATURE DU MILIEU DE CULTURE	28
I . <u>Milieu additionné de méthionine</u>	28
A . Culture en présence de méthionine	28
B . Chromatographie des protéines	32
II . <u>Milieu additionné de cystine</u>	40

CHAPITRE III

ETUDE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINES SOUFRES CHEZ E. COLI AU COURS DE LA CROISSANCE	42
I . <u>Techniques utilisées</u>	42
A . Inoculum faible de bactéries non marquées	42
B . Inoculum important de bactéries non marquées et carencées en soufre	43
C . Inoculum important de bactéries marquées et carencées en soufre	45
II . <u>Discussion des résultats</u>	47

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA SYNTHÈSE DES ACIDES AMINES SOUFRES CHEZ E. COLI SULFAMIDORESISTANT AU COURS DE LA CROISSANCE . COMPARAISON AVEC E. COLI SULFAMIDOSENSIBLE	50
---	----

CHAPITRE V

CINETIQUE DE L'INCORPORATION DU SOUFRE CHEZ E. COLI N	56
I . <u>Technique de culture</u>	56
II . <u>Etude de la croissance</u>	56
III . <u>Etude de la synthèse protéique</u>	59
A . Incorporation du soufre dans les protéines	60
B . Incorporation du soufre dans la cystéine	63

CHAPITRE VI

CINETIQUE DE L'INCORPORATION DU SOUFRE CHEZ E. COLI SULFAMIDORESISTANT . COMPARAISON AVEC E. COLI SULFAMIDO- SENSIBLE	66
I . <u>E. coli SA 5</u>	66
II . <u>E. coli SA 10</u>	72
III . <u>Conclusions</u>	78

CHAPITRE VII

TENTATIVE D'ETUDE DU ROLE DE LA PERMEABILITE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE DANS LA RESISTANCE A LA SULFANI- LAMIDE CHEZ E. COLI	79
I . <u>Obtention de protoplastes de E. coli</u>	80
II . <u>Utilisation des protoplastes pour nos recherches</u>	81

CONCLUSIONS	89
-------------	----

BIBLIOGRAPHIE	91
---------------	----

FACULTE DE PHARMACIE
UNIVERSITE DE NANCY

T H E S E

présentée par Monsieur CHASTE Jean

le 7 Novembre 1936

à Neufchâteau (Vosges)

nationalité : Française

portant le titre : CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIOCHIMIE DU SOUFRE
ET E.COLI SENSIBLE ET RESISTANT A LA SULFANILAMIDE.

, le 30 Octobre 1963
Président de Thèse,



VU et APPROUVE,
NANCY, le 14 novembre 1963
Le Doyen de la Faculté,

A. Bernauer

VU et PERMIS d'imprimer
NANCY, le 6 Novembre 1963
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,



P. IMBS

